



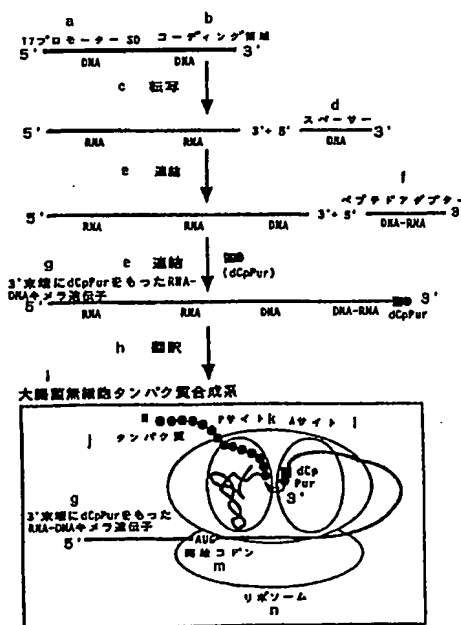
(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, C12P 21/00, C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO98/16636	(43) 国際公開日 1998年4月23日 (23.04.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03766		(74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)	
(22) 国際出願日 1997年10月17日 (17.10.97)		(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) 優先権データ 特願平8/274855 1996年10月17日 (17.10.96)	JP	添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION)[JP/JP] 〒100 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 柳川弘志(YANAGAWA, Hiroshi)[JP/JP] 根本直人(NEMOTO, Naoto)[JP/JP] 〒194 東京都町田市南大谷11号 株式会社 三菱化学生命科学研究所内 Tokyo, (JP) 宮本悦子(MIYAMOTO, Etsuko)[JP/JP] 〒230 神奈川県横浜市鶴見区寺谷1-18-18.Kanagawa, (JP) 伏見 諱(FUSIMI, Yuzuru)[JP/JP] 〒338 埼玉県浦和市神田671-6 Saitama, (JP)			

(54) Title: MOLECULE THAT HOMOLOGIZES GENOTYPE AND PHENOTYPE AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称 遺伝子型と表現型の対応付け分子及びその利用

(57) Abstract

A molecule that homologizes a genotype and a phenotype and is prepared by covalently joining the 3' end of a nucleic acid portion having a base sequence reflecting a genotype to the C-terminus of a protein portion containing a protein participating in phenotypic expression; and a method of constructing a molecule that homologizes a genotype and a phenotype, which comprises the steps of (a) preparing a DNA containing a gene free from termination codon, (b) transcribing the DNA into a RNA, (c) joining a spacer comprising a DNA-RNA chimera to the 3' end of the RNA, (d) further joining to the 3' end of the product of ligation a nucleoside or a substance having a chemical structure analogous to that of the nucleoside, the nucleoside and the substance analogous thereto being capable of forming a covalent bond with an amino acid or a substance having a chemical structure analogous to that of the amino acid, and (e) synthesizing a protein in a cell-free protein synthesis system by using the product of ligation as a mRNA to thereby join the gene-containing nucleic acid portion to the product of gene translation. This molecule is extremely useful in evolutionary molecular engineering for the modification of functional biopolymers, such as enzymes, antibodies and ribozymes, and the creation of biopolymers having functions which living organisms do not possess.



a...PROMOTER  
b...CODING REGION  
c...TRANSCRIPTION  
d...SPACER  
e...LIGATION  
f...PEPTIDE ADAPTER  
g...RNA-DNA CHIMERA GENE BEARING dCpPur AT THE 3' END  
h...TRANSLATION  
i...E. COLI CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS SYSTEM  
j...PROTEIN  
k...P SITE  
l...A SITE  
m...INITIATION CODON  
n...RIBOSOME

## (19) 日本国特許庁 (JP) 再公表特許 (A1)

(11) 国際公開番号

WO 98/16636

(43) 国際公開日 平成10年(1998)4月23日

発行日 平成11年(1999)3月9日

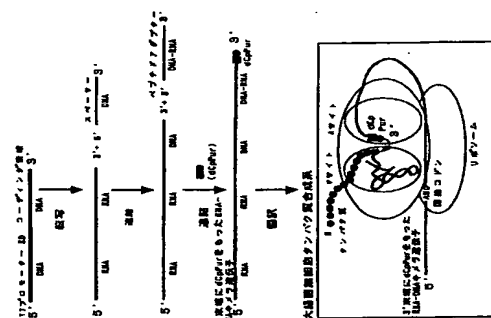
識別記号		F I	
(51) IntCl. <sup>4</sup>			
C12N 15/11			
C12P 21/00			
C12Q 1/68			
出願番号		特願平(0-5)8202	
(21) 国際出願番号	PCT/JP97/03766	(71) 出願人	三菱化学株式会社
(22) 国際出願日	平成9年(1997)10月17日	(72) 発明者	東京部千代田区丸の内2丁目5番2号 柳川 弘志
(31) 優先権主張番号	特願平8-274855	(72) 発明者	東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学 学生命科学研究室内
(32) 優先日	平8(1996)10月17日	(72) 発明者	根本 直人
(33) 優先権主張国	日本(JP)	(72) 発明者	東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学 学生命科学研究室内
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), CA, JP, US	(72) 発明者	宮本 悦子
		(72) 発明者	神奈川県横浜市鶴見区寺谷1-18-18 伏見 順
		(74) 代理人	埼玉県浦和市神田071-6 伊理士 満山 勉

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全68頁)

(54) 【発明の名称】 遺伝子型と表現型の対応付け分子及びその利用

## (57) 【要約】

遺伝子型を反映する塩基配列を有する核酸の3'末端と、表現型の発現に関与するタンパク質を含むタンパク質部のC末端とが共有結合してなる遺伝子型と表現型の対応付け分子、及び、(a) 終止コドンをもたない遺伝子を含むDNAを作成し、(b) 作成したDNAを転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端側にDNAとRNAのキメラの、スベーパーを連結し、(d) さらに得られた連結体の3'末端側に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造を有する物質と共有結合し得る、スクレオニンあるいはスクレオニンに類似した化学構造を有する物質を連結し、(e) 得られた連結体をaRNAとして細胞内タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と、遺伝子の翻訳産物を連結することによりなる遺伝子型と表現型の対応付け分子の構築方法。本発明の遺伝子型と表現型の対応付け分子は、遺伝子工学、すなわち、酵素、抗体、リポザイムなどの機能性生体高分子を改変したり、さらには生物から見出さない機能をもちた生体高分子の創製において用いて有用な物質である。



第4図

## 【特許請求の範囲】

1. 遺伝子型を反映する塩基配列を有する核酸部と、表現型の発現に関与するタンパク質を含むタンパク質部とを含み、前記核酸部と前記タンパク質部とが直接化学結合している、遺伝子型と表現型の対応付け分子。
2. 核酸部の3'末端とタンパク質部のC末端とが共有結合してなる請求の範囲第1項に記載の対応付け分子。
3. タンパク質部のC末端と共有結合する核酸部の3'末端がピュロマイシンである請求の範囲第1項または第2項に記載の対応付け分子。
4. 核酸部が、タンパク質をコードする遺伝子を含み、タンパク質部が該核酸部の遺伝子の翻訳産物である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の対応付け分子。
5. 核酸部が、RNAからなる遺伝子と、前記遺伝子にスベーパーを介して連結したサブレッサー-rRNAとを含む請求の範囲第4項に記載の対応付け分子。
6. 前記サブレッサー-rRNAが、前記遺伝子の終始コドンに対応するアンチコドンを含む、請求の範囲第5項に記載の対応付け分子。
7. 核酸部が、RNAからなる遺伝子と、DNAとRNAとからなるスベーパーとを含む請求の範囲第4項に記載の対応付け分子。
8. 核酸部が、RNAからなる遺伝子と、DNAとポリエチレングリコールとからなるスベーパーとを含む請求の範囲第4項に記載の対応付け分子。
9. 核酸部が、RNAからなる遺伝子と、二本鎖のDNAからなるスベーパーとを含む請求の範囲第4項に記載の対応付け分子。
10. 核酸部が、RNAからなる遺伝子と、RNAと短鎖のペプチド核酸(PNA)またはDNAとの二本鎖からなるスベーパーとを含む請求の範囲第4項に記載の対応付け分子。
11. 核酸部が、DNAからなる遺伝子と、DNAとRNAとからなるスベーパーとを含む請求の範囲第4項に記載の対応付け分子。
12. (a) 遺伝子を含むDNAの3'末端側にサブレッサー-rRNAに対応する配列のDNAをスベーパーを介して連結し、(b) 得られたDNA連結体を転写してRNAにし、

(c) 得られたRNAの3'末端に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結し、(d) 得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝子の翻訳産物とを連結することを特徴とする、請求の範囲第5項に記載の対応付け分子の構築方法。

13. (a) 終止コドンをもたない遺伝子を含むDNAを作成し、(b) 作成したDNAを転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端側にDNAとRNAのキメラのスベーターを連結し、(d) さらに得られた連結体の3'末端側に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結し、(e) 得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝子の翻訳産物とを連結することを特徴とする、請求の範囲第7項に記載の対応付け分子の構築方法。

14. ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質がビューロマイシンである請求の範囲第12項または第13項に記載の構築方法。

15. (a) 終止コドンをもたない遺伝子を含むDNAを作成し、(b) 作成したDNAを転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端側にDNAとポリエチレングリコールのキメラのスベーターを連結し、(d) さらに得られた連結体の3'末端側に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結し、(e) 得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝子の翻訳産物とを連結することを特徴とする、請求の範囲第8項に記載の対応付け分子の構築方法。

16. (a) 終止コドンをもたない遺伝子を含むDNAを作成し、(b) 作成したDNAを転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端側に二本鎖のDNAのスベーターを連結し、(d) さらに得られた連結体の3'末端側に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいは

ヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結し、(e) 得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝子の翻訳産物とを連結することを特徴とする、請求の範囲第9項に記載の対応付け分子の構築方法。

17. (a) 終止コドンをもたない遺伝子とスベーターの塩基配列とを含むDNAを作成し、(b) 作成したDNAを転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端側に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結し、(d) 得られたRNAの連結体の遺伝子部分の3'末端側の部分に短鎖のPNAまたはDNAを加えて二本鎖を形成させ、(e) 得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝子の翻訳産物とを連結することを特徴とする、請求の範囲第10項に記載の対応付け分子の構築方法。

18. 請求の範囲第12項、第13項、第15項、第16項及び第17項のいずれかに記載の方法により、遺伝子を含むDNAから、対応付け分子を構築する構築工程と、構築工程で得られた対応付け分子を淘汰する淘汰工程と、淘汰工程により選択された対応付け分子の遺伝子部分に変異を導入する変異導入工程と、変異導入工程で得られた遺伝子部分を増幅する増幅工程とを含むことを特徴とするタンパク質の進化実験方法。

19. 増幅工程で得られたDNAを構築工程に供することにより、構築工程、淘汰工程、変異導入工程及び増幅工程を繰り返し行うことを特徴とする、請求の範囲第18項に記載のタンパク質の進化実験方法。

20. 請求の範囲第12項、第13項、第15項、第16項及び第17項のいずれかに記載の方法により対応付け分子を構築する構築工程と、構築工程で得られた対応付け分子と他のタンパク質または核酸との相互作用を調べる検定工程とを含むことを特徴とするタンパク質-タンパク質またはタンパク質-核酸相互作用の検定方法。

21. 遺伝子を含むDNAの3'末端側にサブレッサー-tRNAに対応する配列のDNAをス



て行くには、この両者を駆使し得る能力を身に付けねばならないと考えたからである。新しい機能、活性を持つタンパク質を設計するのにこの古典的な方法を転用すれば、部位特異的変異によるタンパク質設計の難しさを回避できる場合がある。「自然の知恵を借りる」と言っても良い。

この方法の欠点は、新しい機能、活性を持つ変異体をスクリーニングするのが難しいことであるが、最近脚光を浴びているRNA触媒は、この困難さをクリアしている。非常に沢山のランダム配列 (10<sup>13</sup>種類) のRNAを合成し、その中から特定の性質をもつRNAを選び出す試みがされている (Ellington, A. D. & Szostak, J. W. [1990] Nature, 346, 818-822)。

これは進化分子工学の一つの例であるが、この例が象徴的に示すように、タンパク質の進化分子工学の第一目標は、従来のタンパク質工学ではまったく考えられないほど広大な配列空間の探索をし、その中から最適配列を選び出すことである。この時、「人知を尽くして」スクリーニングの系を工夫すれば、最適配列の周辺に多数の準最適配列を発見でき、「配列-機能」を研究するための実験系が構築できるのもメリットである。

生体の優れた機能は、進化の過程で獲得されたものであるから、進化を再現できれば、実験室内において、酵素、抗体、リボザイムなどの機能性生体高分子を改造したり、さらには生物から見出せない機能をもった生体高分子を創製することが出来るはずである。タンパク質の改造・創製研究が、工業用触媒としての酵素利用、バイオチップ、バイオセンサー、糖鎖工学などバイオテクノロジーの様々な面において最重要課題であることは言うまでもない。

我々が有用なタンパク質を選び出す時、今なお「スクリーニング」を重宝していることに象徴されるように、構造的理論的な分子設計が未完成な現在、進化的手法はより効率的な方法として実学的な価値がある。より効率的に進化を起こさせる、いわば「タイムマシン」を実験室内につくりだすことができれば、既存の酵素、抗体 (ワクチン、モノクローナル抗体) などのタンパク質を改造するばかりでなく、環境汚染物質の分解酵素や浄化剤など、従来生物界に存在しなかった酵

素や新しいタンパク質を創製する道も拓かれる。従って、タンパク質の進化実験

系が立ち上げられ、産業プロセスの省力化・省エネ化、エネルギー生産、環境保全などの多くの分野に積極的に利用可能であると予想できる。本発明の対応付け分子は、タンパク質の改造などの進化分子工学において極めて有用な物質である。

#### 背景技術

進化分子工学とは、実験室内高速分子進化によって、すなわち実験室において生体高分子の配列空間の適応歩行の仕組みをしらべ、それを最適化することによって機能性高分子の分子設計を行うとするとする学問領域であり、1990年に具体的成果が出始めた全く新しい分子バイオテクノロジーである (伏見顕 (1991) 科学, 61, 333-340; 伏見顕 (1992) 講座進化, 第6巻, 東大出版会)。

生命は分子進化と自然選択の所産である。分子の進化は普遍的な生命現象であるが、その機構は何も過去の進化の歴史を跡づける研究によってのみ解明されるわけではない。むしろ、実験室の中に単純な進化する分子・生命系を構築し、その挙動を研究するというアプローチの方が、分子進化に関する基本的な知見を与え、検証可能な理論の構築と、その分子工学的应用を可能にする。

高分子系が次の5つの条件を満たせば、進化することがわかっている。すなわち、(1) 平衡から速く離れた開放系、(2) 自己増殖系、(3) 突然変異系、(4) 遺伝子型と表現型の対応付け戦略をもつ系、(5) 配列空間上に適切な適応度地形をもつ系、である。(1)と(2)は自然淘汰が起こる条件で、(5)は生体高分子の物性ですでに決まっている。自然淘汰による進化は、(4)の遺伝子型と表現型の対応付けを前提としている。

自然界でも進化分子工学でも次の3種の戦略が採用されている。すなわち、(a) 遺伝子と表現型を同一分子上にのせるリボザイム型、(b) 遺伝子型と表現型の複合体を形成するウイルス型、(c) 遺伝子型と表現型を一つの袋に入れる細胞型、である (第1図)。

(a) の遺伝子型と表現型を同一分子にのせるリボザイム型は、単純な系のため、これまでRNA触媒 (リボザイム) で成功をおさめている (柳川弘志, [1993]

RNAのニューエイジ, pp. 57-77, 羊土社)。

(c) の細胞型の問題点として、(1) 平均化効果、(2) 偏奇効果、(3) ランダム複製効果が考えられる。平均化効果は細胞のゲノムのコピー数が多い場合、遺伝子型と表現型の対応付けが統計的に平均化され、あいまいになるため生ずる。細胞内ではコピー数  $(n)$  の中の一つに過ぎないために性能向上は平均化され、淘汰係数  $(s) / n$  で細胞集団内生存競争を始める。それ故、コピー数  $(n)$  ほど大きなだけ小さい方が細胞型には有利である。しかし、偏奇効果があるために、セグメント数が多い場合、偏奇効果を防ぐためには  $n$  は非常に大きくなくてはならない。したがって、細胞集団内生存競争におけるみかけの淘汰係数は、ウイルス型に比べて極めて小さいことが予想される。淘汰に要する時間は淘汰係数の逆数に比例するから、進化速度はウイルス型に比べて極めて遅くなる。さらに、(3) のランダム複製効果は細胞型にとって致命的である。この効果は、セグメント化された必須遺伝子がランダムに複製されるため、細胞分裂前に必須遺伝子のすべてを複製することは極めて困難なことによる。このことは、有利突然変異がある必須遺伝子に生じて、それが複製されて娘細胞に伝わる確率は極めて小さいことを意味する。

効率よく進化するためには (b) のウイルス型のように遺伝子型と表現型を一体化させる必要がある。

すでに (b) の遺伝子型と表現型の複合体を形成するウイルス型の進化分子工学として、ファージ・ディスプレイ (Smith, G. P. (1985) Science 228, 1315-1317; Scott, J. K. & Smith, G. P. (1990) Science 249, 386-390)、ポリソーム・ディスプレイ (Mattheakis, L. C. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9022-9026)、コード化タグ付ライブラリー (Brenner, S. & Lerner, R. A. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 5381-5383)、セルスタット (Husimi, Y. et al. (1982) Rev. Sci. Instrum. 53, 517-522) をはじめ、様々な手法が提案され、開発されつつある。

しかし、探索可能な配列空間の大きさが進化分子工学において重要であるにもかかわらず、現在のところこれらのウイルス型においては、リボザイム型並みの

配列空間のグローバルな探索法は確立していない。

その理由として、ファージ・ディスプレイなどの現在のウイルスを利用した場合、現在の細胞に寄生しているために、どうしても宿主である細胞によって次のような制限を受ける。すなわち、(1) 細胞に規制されるため、限られた配列空間しか探索できない、(2) 膜透過性、(3) 宿主によるパイアス、(4) 宿主の個体数によるライブラリーの制限、などである。

ポリソーム・ディスプレイ法 (Mattheakis, L. C. & Dower, W. J. (1995) WO 95/11922) は、リボソームを介して核酸とタンパク質を非共有結合で結び付けているため、ペプチド位の鎖長の短いものには向いているが、タンパク質のように鎖長が長くなると、その取り扱いが問題になる。特に、巨大なリボソームをくわえたままなので、選択操作 (たとえば、吸着・溶出など) の際に条件の制約を強く受ける。コード化タグ付ライブラリー (Janda, F. H. & Lerner, R. A. (1996) WO 96/22391) は、ピースを介して化学合成したペプチドと核酸のタグを対応させているが、現在の技術では100塩基程度のタンパク質の化学合成は収率が非常に悪い。そのため、鎖長の短いペプチドには使えるが、鎖長の長いタンパク質には使えない。

これらの問題点を乗り越える一つの方法として無細胞翻訳系の利用が考えられる。無細胞系の中で遺伝子型と表現型を単純に結合したウイルス型戦略分子の長所を挙げてみると、(1) リボザイム型にせまる莫大な変異体集団を合成できる、(2) 宿主に依存しない多様なタンパク質の創製、(3) 膜透過性の問題がない、(4) 21番目のコードが利用でき非天然のアミノ酸を導入できる、などである。

#### 発明の開示

本発明の目的は、上記ウイルス型戦略分子の長所を有する、ファージよりも効率よく、環境条件設定上の制約の少ないウイルス型作業レプリコン、つまり、in vitroウイルスと呼ばれる核酸とタンパク質との間が化学結合で結びついた分子、すなわち、遺伝子型と表現型が対応づけられた分子の提供にある。更に詳述すれば、本発明は、機能性タンパク質やペプチドの創出に利用し得る、遺伝子型 (核

酸)と表現型(タンパク質)の対応付けを無細胞タンパク質合成系を用いて行い、リボソームの上で遺伝子の3'末端部とタンパク質のC末端部を共有結合で連結させ、情報と機能に1:1の対応関係をもつ分子の提供を目的としてなされたものである。また、形成された遺伝子型と表現型の対応付け分子(以下、「*in vitro* ウイルス」ともいう)を試験管内淘汰法により選択し、選択された*in vitro* ウイルスの遺伝子部分を逆転写PCRにより増幅し、さらに変異を導入しながら増幅する操作を繰り返すことにより、莫大な配列空間を探索し、目的とする機能性タンパク質やペプチドを得ることを目的とする。

本発明者等は上記目的を達成すべく鋭意研究の結果、無細胞タンパク質合成系のリボソーム上で核酸とタンパク質が化学的に結合した二種類の遺伝子型と表現型の対応付け分子が構築し得ることを見出した。さらに、その対応付け分子(*in vitro* ウイルス)を試験管内淘汰法により淘汰し、選択された*in vitro* ウイルスの遺伝子部分を逆転写PCRにより増幅し、さらに変異を導入しながら増幅するタンパク質の進化実験系が構築し得ることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

すなわち本発明は、遺伝子型を反映する塩基配列を有する核酸部と、表現型の発現に関与するタンパク質を含むタンパク質部を含み、前記核酸部と前記タンパク質部が直接化学結合している、遺伝子型と表現型の対応付け分子を提供する。

本発明の好ましい態様によれば、核酸部の3'末端とタンパク質部のC末端とが共有結合してなる上記の対応付け分子、及び、タンパク質部のC末端と共有結合する核酸部の3'末端がビュロマイシンである上記の対応付け分子が提供される。

また、本発明の好ましい態様によれば、核酸部が、タンパク質をコードする遺伝子を含み、タンパク質部が該核酸部の遺伝子の翻訳産物である上記の対応付け分子が提供される。核酸部は、好ましくは、RNAからなる遺伝子と、前記遺伝子にスベーターを介して連結したサブレッサー-tRNAを含む。サブレッサー-tRNAは、好ましくは、前記遺伝子の終始コドンに対応するアンチコドンを含む。あるいは、核酸部は、RNAからなる遺伝子と、DNAとRNAまたはDNAとポリエチレングリコ

ール

からなるスベーター部分とを含む。また、核酸部は、DNAからなる遺伝子とDNAとRNAからなるスベーター部分とを含んでもよい。

さらに本発明の別の態様により、(a) 遺伝子を含むDNAの3'末端側にサブレッサー-tRNAに対応する配列のDNAをスベーターを介して連結し、(b) 得られたDNA連結体を転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結し、(d) 得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝子の翻訳産物を連結することを特徴とする遺伝子型と表現型の対応付け分子の構築方法、及び(a) 終止コドンをもたない遺伝子をふくむDNAを作成し、(b) 作成したDNAを転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端側にDNAとRNAのキメラのスベーターを連結し、(d) さらに得られた連結体の3'末端側に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結し、(e) 得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝子の翻訳産物を連結することを特徴とする遺伝子型と表現型の対応付け分子の構築方法が提供される。

また、この発明の好ましい態様によれば、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質がビュロマイシンである上記構築方法が提供される。

また、この発明の別の態様により、(a) 終止コドンをもたない遺伝子をふくむDNAを作成し、(b) 作成したDNAを転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端側にDNAとポリエチレングリコールのキメラのスベーターを連結し、(d) さらに得られた連結体の3'末端側に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結し、(e) 得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝

子の翻訳産物を連結することを特徴とする遺伝子型と表現型の対応付け分子の構築方法が提供される。

また、この発明の別の態様により、(a) 終止コドンをもたない遺伝子を含むDNAを作成し、(b) 作成したDNAを転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端側に二本鎖のDNAのスベアサーを連結し、(d) さらに得られた連結体の3'末端側に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結し、(e) 得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝子の翻訳産物とを連結することを特徴とする、遺伝子型と表現型の対応付け分子の構築方法が提供される。

さらにまた、この発明の別の態様により (a) 終止コドンをもたない遺伝子とスベアサーの塩基配列とを含むDNAを作成し、(b) 作成したDNAを転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端側に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結し、(d) 得られたRNAの連結体の遺伝子部分の3'末端側の部分に短鎖のPNAまたはDNAを加えて二本鎖を形成させ、(e) 得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝子の翻訳産物とを連結することを特徴とする、遺伝子型と表現型の対応付け分子の構築方法が提供される。

またさらに、本発明の別の態様により、上記の構築方法により、遺伝子を含むDNAから、対応付け分子を構築する構築工程と、構築工程で得られた対応付け分子を淘汰する淘汰工程と、淘汰工程により選択された対応付け分子の遺伝子部分に変異を導入する変異導入工程と、変異導入工程で得られた遺伝子部分を増幅する増幅工程とを含むことを特徴とするタンパク質の進化実験方法が提供される。進化実験方法においては、好ましくは、増幅工程で得られたDNAを構築工程に供することにより、構築工程、淘汰工程、変異導入工程及び増幅工程が繰り返し行われる。また、遺伝子を含むDNAの3'末端側にサブプレサースRNAに対応する配列のDNAをスベアサーを介して連結する第一連結手段、第一連結手段で得られたDNA

連結体をRNAに転写する転写手段、転写手段で得られたRNAの3'末端に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結する第二連結手段、及び、第二連結手段で得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝子の翻訳産物を連結する第三連結手段を含む対応付け分子の構築手段、または、遺伝子を含むDNAをRNAに転写する転写手段、転写手段で得られたRNAの3'末端側にDNAとRNAのキメラもしくはDNAとポリエチレングリコールのキメラもしくはDNAとDNAからなる二本鎖もしくはRNAと短鎖のペプチド核酸(PNA)もしくはDNAからなる二本鎖のスベアサーを連結する第一連結手段、第一連結手段で得られたRNA-スベアサー連結体の3'末端に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結する第二連結手段、及び、第二連結手段で得られた連結体をmRNAとして無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行い、遺伝子を含む核酸部と前記遺伝子の翻訳産物を連結する第三連結手段を含む対応付け分子の構築手段と、構築された対応付け分子を淘汰する手段と、選択された対応付け分子の遺伝子部分に変異を導入する手段と、変異導入された遺伝子部分を増幅する手段とを備えることを特徴とする、上記の進化実験方法を行う装置も提供される。

さらに、本発明の別の態様により、上記の構築方法により対応付け分子を構築する構築工程と、構築工程で得られた対応付け分子と他のタンパク質または核酸との相互作用を調べる検定工程とを含むことを特徴とするタンパク質-タンパク質またはタンパク質-核酸相互作用の検定方法が提供される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、遺伝子型(核酸部)と表現型(タンパク質部)の対応付け戦略を示す図である。

第2図は、核酸部とタンパク質部が部位指定的である、本発明の遺伝子型と表現型の対応付け分子の構築方法を示す図である。

第3図は、遺伝子型と表現型の対応付け分子(in vitroウイルス)構築のポリ



ントとなる核酸部3'末端の化学修飾部を示す図である。

第4図は、核酸部とタンパク質部が部位非指定的である、本発明の遺伝子型と表現型の対応付け分子の構築方法を示す図である。

第5図は、部位指定的方法におけるスベーターの最適化を示す電気泳動写真である。作成したa, b, c画分の長さのそれぞれRNAゲノムをピオチン化リジン tRNAと一緒に大腸菌無細胞翻訳系で翻訳した後、ストレプトアビジン付き磁性体粒子に特異的に吸着させ、逆転写し、PCRにより増幅されたDNAの、4%ポリアクリルアミド電気泳動 (8M尿素存在下) の結果である (染色は銀染色)。レーン1はa画分のスベーターの長さ (255-306残基) のもの、レーン2はb画分のスベーターの長さ (102-238残基) のもの、レーン3はc画分のスベーターの長さ (0-85残基) のものである。

第6図は、部位指定的方法による核酸部とタンパク質部との連結を示す電気泳動写真である。レーン1はタウタンパク質の4リピード領域をコードするmRNAを大腸菌無細胞翻訳系で[35S]メチオニンを用いてラベルした翻訳産物、レーン2は該mRNAの3'末端にピュロマイシンをもつsup tRNAを連結し、このmRNAの5'末端を[32P]でラベルし、大腸菌無細胞翻訳系で翻訳した産物の、18%ポリアクリルアミド電気泳動 (8M尿素、SDS存在下) の結果である。

第7図は、部位非指定的方法による核酸部とタンパク質部との連結を示す電気泳動写真である。レーン1はタウタンパク質の4リピード領域をコードするmRNAを大腸菌無細胞翻訳系で[35S]メチオニンを用いてラベルした翻訳産物、レーン2は該mRNAの3'末端にDNAスベーターを介し、5'末端を[32P]でラベルしたピュロマイシンを連結したmRNAを大腸菌無細胞翻訳系で翻訳した産物、レーン3はレーン2の翻訳産物をリボヌクレアーゼT2で消化したものの、18%ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS存在下) の結果である。

第8図は、本発明の遺伝子型と表現型の対応付け分子 (in vitroウイルス) の構築方法の一例を示す図である。

第9図は、ヒトタウタンパク質のN末端半分 (1-165) のC末端へのrCpPurの

結合を示す電気泳動写真である。3つのゲノムすなわちヒトタウタンパク質のN

末端半分 (1-165) をコードするmRNAの3'末端に、ストップコドンをもつDNAスベーターはまたないもの (左端のレーン)、ストップコドンとDNAスベーターの両者をもたないもの (左から2番目のレーン)、ストップコドンはまたないがDNAスベーターをもつもの (左から3番目のレーン) をそれぞれ構築し、32Pで標識したrCpPur存在下でウサギ網状赤血球抽出液を用いた無細胞翻訳系で30°Cで20分間翻訳を行わせた。翻訳産物は11.25% SDS-PAGEで分析した。右端のレーンはヒトタウタンパク質のN末端半分 (1-165) をコードするmRNAを[35S]メチオニン存在下で上と同じ条件下で翻訳させたものである。

第10図は、無細胞翻訳系でのin vitroウイルスの生成を示す電気泳動写真である。(A)はin vitroウイルスの生成の時間経過を示している。ヒトタウタンパク質のN末端半分 (1-165) をコードするmRNA-DNAスベーター (105 mer) -ペプチドアクセプター-rCpPurからなるゲノムを[35S]メチオニンを含むウサギ網状赤血球抽出液を用いた無細胞翻訳系で翻訳させ、その翻訳産物を30°Cで時間を追って (5分、10分、20分、40分) 調べた。翻訳産物は11.25% SDS-PAGEで分析した。左端のレーンはヒトタウタンパク質のN末端半分 (1-165) をコードするRNAをmRNAとして用い、上と同じ条件下で[35S]メチオニンのタンパク質への取り込みを調べたものである。右端のレーンは32Pで標識されたin vitroウイルスゲノムである。(B)はin vitroウイルスの生成に対するin vitroウイルスゲノムの濃度の影響を示している。レーン1はゲノムの3'末端を[32P]rCpPurでラベルしたものの、レーン2はゲノム (1.2μg) の3'末端にrCpPurがついたもの、レーン3はゲノム (0.33μg) の3'末端にrCpPurがついたもの、レーン4はゲノム (0.64μg) の3'末端にrCpPurがついたものである。レーン2~4は、ゲノムを[35S]メチオニンを含むウサギ網状赤血球抽出液を用いた無細胞翻訳系で、30°Cで20分間翻訳させた。翻訳産物は、11.25% SDS-PAGEで分析した。

第11図は、無細胞翻訳系でのin vitroウイルスの生成を示す電気泳動写真である。ヒトタウタンパク質のN末端半分 (1-165) をコードするmRNA-DNAスベーター (105 mer) -ペプチドアクセプター-[32P]rCpPurからなるin vitroウイル

スゲノムを、ウサギ網状赤血球抽出液を用い、30°Cで20分間翻訳させた。翻訳産

物は11.25% SDS-PAGEで分析した。ゲノムとタンパク質の結合はナタ豆 (mungbean) のヌクレアーゼで消化することによって確認された。翻訳産物 (レーン3) をナタ豆のヌクレアーゼで消化すると、ヒトタウタンパク質のN末端半分 (1-16) のモノマーとダイマー (レーン1) に相当する位置にバンドが現われた (レーン4)。レーン2は32Pで標識されたin vitroウイルスゲノムである。

第12図は、in vitroウイルスを用いたタンパク質の進化実験方法の工程を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、いくつかの術語を用いるが、ここで用いるときそれらの術語は次の意味を有する。「核酸部」とは、RNA、DNA、PNA (Peptide nucleic acid, ペプチド核酸；核酸塩基がアミノ酸類似体を介してつながった重合体) などのようなヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質の連結体を意味し、「タンパク質部」とは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸などのようなアミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質の連結体を意味する。「サブレッサー (sup tRNA)」とは、mRNA上の終止コドンにあるアミノ酸に対応するコドンとして読むなどのように、構造変化するこにより変異を抑圧することができるtRNAをいう。「遺伝子型を反映する塩基配列を有する」とは、遺伝子型に関係する遺伝子またはその部分を含むことを意味する。「表現型の発現に関与するタンパク質を含む」とは、それ自体の発現が表現型の形質となったり、酵素等としての働きにより表現型の形質の発現に関わったりするタンパク質を含むことを意味する。

核酸部の3'側に位置するスベーカーは、好ましくはその長さが100Å以上、さらに好ましくは100~1000Å程度の高分子物質であれば如何なる物であっても良い。具体的には、天然または合成のDNAやRNAの一本鎖、DNAとDNAの二本鎖、RNAと短鎖 (例えば15~25ヌクレオチド程度) のPNAまたはDNAからなる二本鎖、多糖類等の高分子物質や、ポリエチレングリコール、好ましくは分子量3,000~30,000

0程度のポリエチレングリコール等の有機合成高分子物質等を挙げることができる。

本発明の対応付け分子の核酸部とタンパク質部は、共有結合などの化学結合で連結される。特に、核酸部3'末端のヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質あるいはその連結体と、タンパク質部C末端のアミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質が化学的に結合、例えば共有結合したものが好ましい。

核酸部とタンパク質部の結合には、例えば、核酸部の3'末端に化学結合としてアミド結合を有するピューロマイシン (Puromycin)、3'-N-アミノアシルピュロマイシンアミノヌクレオシド (3'-N-Aminoacylpurumycin aminonucleoside, PANS-アミノ酸)、例えばアミノ酸部がグリシンのPANS-Gly、バリンのPANS-Val、アラニンのPANS-Ala、その他、全アミノ酸に対応するPANS-全アミノ酸が利用できる。また、化学結合として3'-アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合した結果形成されたアミド結合でつながった3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド (3'-Aminoacyladenine aminonucleoside, AANS-アミノ酸)、例えばアミノ酸部がグリシンのAANS-Gly、バリンのAANS-Val、アラニンのAANS-Ala、その他、全アミノ酸に対応するAANS-全アミノ酸が利用できる。また、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドとアミノ酸のエステル結合したものなども利用できる。その他、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質と、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質を化学的に結合可能な結合様式のものなら全て利用することができる。

本発明の遺伝子型と表現型の対応付け分子は、例えば、以下に示す (1) 核酸部とタンパク質部の結合が部位指定的な方法、または (2) 核酸部とタンパク質部の結合が部位非指定的な方法によって構築することができる。

まず、(1) 核酸部とタンパク質部の結合が部位指定的な方法について述べる。

この方法においては、(a) 遺伝子を含むDNAの3'末端側にsup tRNAに対応する配列のDNAをスベーカーを介して連結し、(b) 得られたDNA連結体を転写してRNA

にし、(c) 得られたRNAの3'末端に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学

構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質、例えばピュロマイシンを連結し、(d) 得られた連結体をmRNAとして、無細胞タンパク質合成系、例えば大腸菌の無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行うことにより、(e) 遺伝子RNA (遺伝子型) とその翻訳産物のタンパク質 (表現型) とが、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質、例えばピュロマイシンを介して化学的に結合した遺伝子型と表現型の対応付け分子を構築することができる。

すなわち、本発明の方法によれば、タンパク質の合成において、リボソームのAサイトに終止コドンが来たときにsup tRNAが対応して入り、ペプチルトランスフェラーゼの作用により、sup tRNAの3'末端のヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質、例えばピュロマイシンがタンパク質と結合する (第2図)。だから、この方法は核糖部とタンパク質の結合が遺伝コードに依存した部位指定的である。

ピュロマイシン (第3図) は細菌 (Nathans, D. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 51, 585-592; Takeda, Y. et al. (1960) *J. Biochem.* 48, 169-177) 及び動物細胞 (Ferguson, J. J. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 57, 616-617; Nemeth, A. M. & de la Haba, G. L. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 1190-1193) のタンパク質合成を阻害することが知られている。ピュロマイシンの構造はアミノシルtRNAの構造と類似していて、リボソームのPサイトに結合しているペプチジルtRNAと反応し、ペプチジルピュロマイシンとしてリボソームから遊離するためタンパク質合成が中断される (Harris, R. J. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 240, 244-262)。

ネイティブ (native) なsup tRNAを精製してmRNAに連結する方法は、sup tRNAの精製やアミノ酸とtRNAの3'末端のエステル結合の加水分解のし易さなどの問題があり実用的ではない。これまで、tRNA identityの研究で未修飾のtRNAがインタクト (intact) なtRNAと同様にアミノアシル化されることや、アミノアシル化された未修飾のtRNAがリボソームに取り込まれ翻訳されることがわかっている

(Shimizu, M. et al. (1992) *J. Mol. Evol.* 35, 436-443)。また、sup tRNAを作

成するために、tRNAのアイデンティティーが利用されている。

アラニン、ヒスチジン、ロイシンのアミノアシル合成酵素は、これらのアンチコドンを確認していないことがわかっている (Tamura, K. et al. (1991) *J. Mol. Recog.* 4, 129-132)。したがって、アラニンのtRNAのアンチコドンを終止コドン (例えば、アンバー) に変えると、終止コドンに対応してアラニンのtRNA (sup tRNA) が取り込まれることが期待できる。

ここで問題になるのが、通常のtRNAと異なり、RNAse Pなどによって5'側が整形されていないtRNAでもリボソームのAサイトに入るかどうかである。これは本モデルの可否を決定する上で、調べなければならない最も重要な課題である。Brome Mosaic Virus (BMV) やTurnip Yellow Mosaic Virus (TYMV) は、その3'末端がtRNA様構造をしており、アミノアシルシンターゼによりアミノアシル化され、無細胞翻訳系で1%の効率でアミノ酸が取り込まれることがわかっている (Chen, J. M. & Hall, T. C. (1973) *Biochemistry* 12, 4570-4574) 。BMVのRNAがリボソームに1%でも取り込まれるならば、3'末端にインタクト (intact) なtRNAをもったRNAならば、もう少し効率良く入る可能性がある。仮に、インタクトなtRNAの10%以下の効率で取り込まれるとしても、濃度効果で十分にリリースファクター (Release factor) との競争に勝てる可能性がある。

そこで、mRNA-sup tRNA (mRNAの3'側にスベーターを介してsup tRNAを連結したもの) の3'末端にタンパク質を結合させる実験の前に、mRNAと切り離したsup tRNAでもリボソームのAサイトに入り、タンパク質と結合するかどうかを調べてみた。実際に、sup tRNAの3'末端にピュロマイシンを結合させたsup tRNAを調製し、これを無細胞タンパク質合成系に投入し、sup tRNA部分がリボソームのAサイトの終止コドンに対応して入り、タンパク質と結合するかどうか調べた。mRNAはタウ・タンパク質の4リピード領域 (127残基) を用いた (Goedert, M. (1989) *EMBO J.* 8, 392-399)。その結果、無細胞タンパク質合成系で翻訳させるところ、3'末端にピュロマイシンをもつsup tRNAはリボソームのAサイトの終止コドンに対応して入り、タンパク質と結合することが確認できた (第2図)。

次に、mRNAとsup tRNAとの間のスベーターの長さを変えたRNA-sup tRNA連結体を

構築して、リボソームのAサイトにsup tRNA部分が最も効率良く取り込まれるスベーカーの最適の長さを、in vitroセレクション法によって選択する試みをした。その結果、あるスベーカー長をもつRNA-sup tRNA連結体がその翻訳産物のタンパク質と効率よく化学的に結合することがわかった。

本発明の遺伝子型と表現型の対応付け分子を構築するためには、まず核酸部の3'末端につける、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオチドあるいはヌクレオチドに類似した化学構造骨格を有する物質、例えば、2'-デオキシシチジルビルビュロマイシン (dCpPur) やリボシチジルビルビュロマイシン (rCpPur) (第3図) を合成する必要がある。

dCpPurを合成する方法の一例は次の通りである。まずビュロマイシンの5'水酸基をオキシ塩化リンとリン酸トリメチルを用いて化学的にリン酸化することにより、ビュロマイシン-5'モノリン酸をつくることができる。次に、ビュロマイシン-5'モノリン酸にトリフルオロ酢酸とトリフルオロ酢酸無水物を反応させることにより、ビュロマイシン-5'モノリン酸のアミノ酸部のアミノ基とリボース部の2'水酸基を保護できる。これに、デオキシシチジンのピリミジン環内のアミノ基とリボース部の5'水酸基を保護したBz-DMTデオキシシチジンを縮合剤、ジシクロヘキシルカルボジイミド存在下で反応させた後、酢酸とアンモニアで脱保護することにより、2'-デオキシシチジルビルビュロマイシン (dCpPur) が得られる。dCpPurの5'水酸基をポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化することにより、pdCpPurを得ることができる。

リボシチジルビルビュロマイシンはビュロマイシンと保護基のついたrC-ベータアミダイトをテトラゾール存在下で縮合させ、さらに酸化、脱保護することによりつくることができる。

次に、核酸部とタンパク質部を部位指定的につなげるための核酸部を構成する連結体の構築について述べる。

部位指定的な方法に用いる核酸部を構成する連結体としては、例えば、5'-T7プロモーター領域-シャイン・ダルガーノ配列 (SD) 領域-mRNA領域-スベーカー

一領域-sup tRNA領域-ビュロマイシン領域-3'の順につながつた連結体を挙

げることができる。

この核酸部の連結体の構築においては、先ず、htau24と呼ばれるヒトタウタンパク質 (Goedert, M. (1989) EMBO J. 8, 392-399) の微小管結合領域である4リビート領域をT7プロモーターの下流に挿入したプラスミド (pAR3040) を構築し、それを制限酵素BglIIとBamHIで切断し、直線DNAとする。このDNAを鋳型にして、T7領域を含む上流側 (forward) とSD領域と開始コドン付近の領域を含む下流側 (backward) のプライマーを用いて、Taq DNAポリメラーゼでPCRを行い、増幅する。

このとき、backwardのプライマーにはタンパク質合成した後タンパク質部の放射性のメチオニンの検出感度を高めるため、メチオニンを3個増す。すなわち、4リビート領域の4番目のロイシン及び5番目と8番目のロイジンをそれぞれメチオニンに置換する。結局、翻訳された4リビートタンパク質は合計4個のメチオニンを含む。次に、forwardのプライマーとして上記のbackwardのプライマーと相補鎖を用い、backwardのプライマーは4リビートのC末端に終止コドンとしてアンバーコドンがくるように設計したプライマーを用い、先の直線化した4リビート領域を含むDNAを鋳型として、PCRで増幅する。

PCRで増幅した二つのDNA断片、すなわちT7プロモーターとSD領域を含むDNA断片と4リビート領域を含むDNA断片をまぜ合わせ、最初プライマーなしで伸長させ、次にT7プロモーターの配列を含むプライマーをforwardに、4リビート領域のC末端の終止コドンを含むプライマーをbackwardに用い、再度PCRで増幅する。

このDNA連結体 (T7プロモーター-SD-4リビート) に、両端に付着末端をもつT7残基からなる二本鎖DNA断片をDNAリガーゼでタンデムに連結させ、スベーカーの長さの異なる連結体をつくる。

連結後、ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) により長さを基準にして三つ画分 (a, b, c) に分画する。スベーカーは(17)nで、a画分はn=15-18、b画分はn=6-14、c画分はn=0-5である。sup tRNAは、天然のアラニンtRNAの数カ所の配列とアンチコドンの配列をアンバー (UAG) に改変したものを化学合成により調製す

る。このsup tRNAにスベーターの長さの異なるa、b、c画分の連結体をT4 DNAリガーゼで連結させる。連結部位には過剰量の本鎖の裏打ちDNAを用い、一度温度を上昇させ融解させた後、アニールさせ、相補鎖をつくらせた後、連結させる。連結後、連結体の5'末端と3'末端のプライマーを用い、PCRで増幅させる。このDNA連結体をT7 RNAポリメラーゼを用いて転写し、RNAの連結体をつくる。

このRNA連結体の3'末端に先に化学合成したpdCoPurをT4 RNAリガーゼで連結させることにより、無細胞のタンパク質合成系の遺伝子として使うことのできるRNA連結体、5'-T7プロモーター領域-SD領域-4リビート領域-スベーター領域-sup tRNA領域-ビュロマイシン-3'を得ることができる。

無細胞タンパク質合成系、例えば大腸菌やウサギ網状赤血球 (rabbit reticulocyte) 等の無細胞タンパク質合成抽出液に上記のRNA連結体をmRNAとして加えタンパク質合成を行う。核酸部 (RNA) とタンパク質部が最も効率よく連結されるための最適スベーター長を求めるためには次のような実験を行う。

すなわち、三種の異なるスベーター長、a、b、c画分をもつ上記RNA連結体を遺伝子としての無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質合成を行う。このとき、リジンにそのε-アミノ基を介してピオチンが連結した修飾リジンをチャージしたtRNAを加えると、翻訳された4リビートのタンパク質のいくつかのリジン残基の位置にピオチンリジンが取り込まれる。タンパク質合成後、表面にストレプトアヴィジンが連結した磁性体ビーズを加え、ピオチンを取り込んだタンパク質を釣り上げる。

核酸部 (RNA) がビュロマイシンを介してタンパク質部が連結していれば、タンパク質のC末端に核酸部 (RNA) がついているはずである。磁性体ビーズでRNA-タンパク質連結体が本当に釣り上がったかどうかを確かめるために、4リビートのN末端領域に対応する配列をforwardプライマーに、sup tRNAの3'末端部をbackwardプライマーに用いて、逆転写を行い、ポリアクリルアミド電気泳動で調べると、c画分のスベーター長の逆転写されたDNAのバンドが確認される。このことは、c画分のスベーター長をもつRNA連結体が最も効率よくタンパク質部と連結することを意味する。

次に、(2) 核酸部とタンパク質部の結合が部位非指定的な方法について述べる。

この方法においては、(a) 終止コドンをもたない遺伝子を含むDNAを作成し、(b) 作成したDNAを転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端側にDNAとRNAのキメラのスベーターを連結し、(d) さらにその3'末端側に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオチドあるいはヌクレオチドに類似した化学構造骨格を有する物質、例えばビュロマイシンを連結し、(e) 得られた連結体をmRNAとして、上記無細胞タンパク質合成系、例えば大腸菌の無細胞タンパク質合成系でタンパク質合成を行うことにより、(f) 遺伝子RNAとその翻訳産物のタンパク質とがビュロマイシンを介して化学的に結合した遺伝子型と表現型の対応付け分子を構築することができる。すなわち、本発明の方法によれば、核酸部3'末端のヌクレオチドあるいはヌクレオチドに類似した化学構造骨格を有する物質、例えばビュロマイシンがリボソームのAサイトに、リボソーム上のmRNAの終止コドンに対応して入るのでなく、スベーターの長さに応じてランダムに入り、ペプチルトランスフェラーゼの作用により、RNA-DNAキメラ核酸部の3'末端のビュロマイシンがタンパク質と化学的に結合する (第4図)。だから、この方法は核酸部とタンパク質の結合が遺伝コードに非依存の部位非指定的である。

この方法においては、核酸部の連結体に部位非指定的なものを用い、上記(1)の部位指定的な方法と同様の方法で、遺伝子型と表現型の対応付け分子を構築できる。

部位非指定的な方法に用いる核酸部の連結体としては、例えば、5'-T7プロモーター領域-シャイン・ダルガーノ配列 (SD) 領域-mRNA領域-スベーター領域-ビュロマイシン領域-3'の順につながつた連結体を挙げることができる。

この核酸部の連結体の構築においては、先ず、T7プロモーター領域から4リビート翻訳領域の終りまでの連結体の構築は、前記(1)部位指定的な方法の核酸部の連結体の構築のところで述べた方法に準ずるが、違うところは前記で構築した連結体を鎖型にしてPCRで増幅する際に、backwardのプライマーに4リビート

のC末端の二つの終止コドン、オーカー (CTG) とアンバー (TAA) をそれぞれCA G (グルタミン) とAAA (リジン) に変え、終止コドンをなくするように設計したプライマーを用いることである。

このDNAの連結体を鎖型にしてT7 RNAポリメラーゼを用いて転写し、対応するRNAの連結体をつくる。この一本鎖のRNA連結体に化学合成した一本鎖のDNAリンカー (鎖長20、40、60、80ヌクレオチド) をそれぞれ別々にT4 RNAリガーゼを用いて連結させる。次に、この連結体にペプチドアセプターと名付けた25残基からなる一本鎖のDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチド (DNAは21残基、RNAは4残基) を裏打ちの一本鎖DNA存在下で、T4 DNAリガーゼを用いて連結させる。

ペプチドアセプターの配列は、アラニルtRNAの3'末端配列を有しており、リボゾームのAサイトへのピュロマイシン誘導体の取り込みを促進させるものである。スベーター領域とピュロマイシン領域との間にペプチドアセプターを用いることが好ましい。

この連結体の3'末端に先に化学合成したpdCpUtrをT4 RNAリガーゼで連結させることにより、無細胞のタンパク質合成系の遺伝子として使うことのできるRNA-DNAキメラ連結体、5'-TTプロモーター領域 (RNA) -SD領域 (RNA) -4リビート領域 (RNA) -スベーター領域 (DNA) -ペプチドアセプター領域-ピュロマイシン-3'を得ることができる。

上記のRNA-DNAキメラ連結体を遺伝子として、前記無細胞タンパク質合成系を用いてタンパク質合成を行えば、核酸部 (RNA-DNAキメラ連結体; 遺伝子型) とタンパク質部 (表現型) がピュロマイシンを介して化学結合でつながった連結体を得ることができる。

また、上記方法において、DNAとRNAのキメラのスベーターの代わりに、DNAとポリエチレングリコールのキメラのスベーターを用いることができる。

さらに、また、上記方法において、DNAとRNAのキメラのスベーターの代わりに、DNAとDNAの二本鎖、RNAと短鎖 (例えば15~25ヌクレオチド程度) のRNAまたはDNAからなる二本鎖のスベーターを用いることができる。DNAとDNAの二本鎖からなるスベーターは、全長にわたって二本鎖である必要はなく、大部分が二本鎖 (通

常、両末端の数残基が一本鎖で他の部分が二本鎖) であればよい。RNAと短鎖のRNAまたはDNAからなる二本鎖スベーターは、(a) 終止コドンをもたない遺伝子とスベーターの塩基配列とを含むDNAを作成し、(b) 作成したDNAを転写してRNAにし、(c) 得られたRNAの3'末端側に、アミノ酸あるいはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質と共有結合し得る、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質を連結し、(d) 得られたRNAの連結体の遺伝子部分の3'末端側の部分に短鎖のRNAまたはDNAを加えて二本鎖を形成させることによって作成することができる。

なお、本明細書における、核酸の単離・調製、核酸の連結、核酸の合成、PCR、プラスミドの構築、無細胞系での翻訳等の遺伝子操作技術は、特に明記しない限り、Samrook et al. (1989) Molecular Cloning, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載の方法またはそれに準じた方法により行うことができる。

本発明の対応付け分子は、上記に例を挙げた方法の他、各構成要素を順次、公知の科学的結合方法によって連結することによって得ることもできる。

本発明のタンパク質の進化実験方法は、第12図に示すように、(1) in vitro ウイルスゲノムの構築、(2) in vitro ウイルスの完成、(3) 淘汰プロセス、(4) 変異導入、(5) 増幅、の工程を含む方法であり、これらの工程により、あるいはこれらの工程を必要に応じて繰り返すことにより機能性タンパク質の改変及び創製が可能となる。この内、(1) 及び (2) の工程については上記に詳述した構築方法に従って行うことができる。すなわち、(1) の工程は、ヌクレオシドあるいはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質の連結した連結体の構築に相当し、(2) の工程は、当該連結体からの対応付け分子の構築に相当する。従って、ここでは (3)、(4) 及び (5) の工程について述べる。

(3) 淘汰プロセスとは、in vitro ウイルスを構成するタンパク質部の機能 (生物活性) を評価し、目的とする生物活性に基づいて in vitro ウイルスを選択する工程を意味する。このような工程は公知であり、例えば、Scott, J. K. & Smith, G. P. (1990) Science, 249, 386-390; Devlin, P. E. et al. (1990) Science, 249, 404-406; Mattheakis, L. C. et al. (1994) Proc

Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91,

9022-9026等に記載されている。

次に(4)変異導入及び(5)増幅の工程において、選択されたin vitroウイルスの核酸部に変異を導入してPCR等で増幅する。ここで、in vitroウイルスの核酸部がRNAの場合は、逆転写酵素によりcDNAを合成した後に変異の導入を行えば良く、核酸部の増幅は変異導入しながら行っても良い。変異導入は、すでに確立しているError-prone PCR (Leung, D. W., et al., (1989) J. Methods Cell Mol. Biol., 1, 11-15) やSexual PCR (Stemmer, W. P. C. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 10747-10751) を用いて容易に行うことができる。

変異が導入され増幅されたin vitroウイルスの核酸部を用いて(1) in vitroウイルスゲノムを構築し、それを用いて(2) in vitroウイルスを完成させて(3)淘汰プロセスにかけ目的とする生物活性によって選択し、(4)変異導入及び増幅を行うことができる。これらの工程を必要に応じて繰り返すことにより、機能性タンパク質の改変及び創製が可能となる。

上記進化実験法を行う本発明の装置における各手段自体はそれぞれ公知のものであり、これらの手段における、試薬の添加、攪拌、温度制御、生物活性評価等の操作は、それ自体既知の方法により行えば良い。これらの操作を組み合わせ、全自動または半自動の本発明の装置を構築することができる。

本発明のタンパク質-タンパク質またはタンパク質-核酸の相互作用の検定方法における、対応付け分子を構築する構築工程は、一般には、(1)遺伝子ライブラリーやcDNAライブラリーからmRNAを合成し、in vitroゲノムを構築する工程及び、(2)無細胞タンパク質合成系を利用して、mRNAとそれに対応するタンパク質とをリボソーム上で連結したin vitroウイルスを構築する工程を含む。

(1)の工程は、配列既知のDNAでORFに対応する配列を含むcDNAや配列未知のDNAで適当な制限酵素で断片化した断片を含むcDNAからRNAポリメラーゼを用いてmRNAを合成し、in vitroウイルスゲノムを構築することに相当する。

上記(1)のin vitroウイルスゲノムの構築と、(2)のin vitroウイルスの

構築の工程は、上記に詳述した構築方法に従って行うことができる。

また、対応付け分子と他のタンパク質や核酸 (DNAまたはRNA) との相互作用を調べる検定工程は、一般には、(3)(2)の工程で構築されたin vitroウイルスの中から特定の機能をもつタンパク質のみを選択する工程、及び、(4)選択したin vitroウイルスを逆転写、増幅し、配列を決定する工程を含む。

(3)の工程では、標的のタンパク質や核酸 (DNAまたはRNA) や他の物質、例えば糖質や脂質などをマイクロプレートやビーズに予め共有結合や非共有結合を介して結合させておき、これに(2)の工程で構築したin vitroウイルスを加える温度条件で、一定時間反応させた後、洗浄し、標的に結合しないin vitroウイルスを除去する。その後、標的に結合したin vitroウイルスを遊離させる。本工程はすでに確立しているELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Crowther, J. R. (1995) Methods in Molecular Biology, Vol. 42, Human a Press Inc.) に準じて行うことができる。

(4)の工程では、(3)の工程で遊離したin vitroウイルスを逆転写PCRにより逆転写、増幅させ、増幅したDNAをお互接あるいはクローニングした後、その配列を決定する。

本発明の検定方法により、(1)配列既知あるいは未知の遺伝子DNAからmRNAを合成し、in vitroウイルスゲノムを構築し、(2)それを用いてin vitroウイルスを構築し、(3)in vitroウイルスの中から標的のタンパク質あるいは核酸あるいは他の物質、たとえば糖質や脂質などと結合するもののみを選択し、(4)選択したin vitroウイルスを逆転写、増幅、クローニング、配列決定することにより、機能未知の遺伝子に対応する遺伝子産物 (タンパク質) の機能を同定することが可能になる。

上記の相互作用の検定方法を行うために、公知の適切な手段を組み合わせ装置を構築してもよい。本装置における各手段自体はそれぞれ公知のものであり、これらの手段における、試薬の添加、攪拌、温度制御、生物活性評価等の操作は、それ自体既知の方法により行えば良い。これらの操作を組み合わせ、全自動または半自動の、相互作用の検定方法を行うための装置を構築することができる。

## 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発明についての具体的認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものでない。

### 実施例1 in vitroウイルスの調製 (1)

#### ＜1＞核酸部の3'末端部の調製

##### (a) リン酸化ビュローロマイシン (pPur) の合成

材料：ビュローロマイシン [3'-[ $\alpha$ -Amino-p-methoxyhydrocinnamamido]-3'-deoxy-N, N'-dimethyl-adenosine] はシグマから購入した。オキシ塩化リン (Phosphorous oxychloride)、リン酸トリメチル (Trimethyl phosphate) は和光純薬から購入した。

方法：1.5 mmol のオキシ塩化リンと11.4 mmol のリン酸トリメチルを混合した溶液を氷冷し、0.3 mmol のビュローロマイシン (Puromycin) を加えてよく混合し、0℃で7時間反応させた (Yoshikawa, M. et al. (1969) Bull. Chem. Soc. Jap. 42, 3505-3508)。次に、氷令した40 ml のアセトンと20 ml のエーテルとして0.4 g の過塩素酸ソーダ (NaClO<sub>4</sub>) の混合液に反応液を加えてよく攪拌した。720 ml の水を加えて4℃で一昼夜攪拌し、塩素基を加水分解する。加水分解して沈澱した生成物を遠心で分離し、アセトンとエーテルで洗浄する。白い粉末を真空下で乾燥し、リン酸化ビュローロマイシンをビュローロマイシンに対して70-90%の収率で得た。

##### (b) リン酸化ビュローロマイシンのアセチル化保護

材料：トリフルオロ酢酸 (TFA) はナカライテスクから購入した。トリフルオロ酢酸無水物 (TFAA) は和光純薬から購入した。

方法：0.2 mmol の乾燥したリン酸化ビュローロマイシンと5 ml のTFAを混合し、10℃で2 ml のTFAAを加えて攪拌した。室温で混合しながら1時間反応させた (Weygand, F. & Gieger, R. (1956) Chem. Ber. 89, 647-652)。50 ml の水を加えて反応を止め、水 (10 ml) を加えては減圧下で蒸発乾固する操作を5回繰り返すことによりTFAを除去した。最後に50 ml の水を加えて凍結乾燥し、ビュローロ

イシンのアミノ酸部のアミノ基とリボース部の2'水酸基をアセチル基で保護したリン酸化ビュローロマイシンをリン酸化ビュローロマイシンに対して50-60%の収率で得た。

#### (c) dGpPur (2'-Deoxyxycytidyl[3'→5']puromycin) の合成

材料：Bz-DMTデオキシシチジン (N4-Benzoyl-5'-O-[4, 4'-dimethoxytrityl]-2'-deoxycytidine) はシグマから、DCC (Dicyclohexyl carbodiimide) は渡辺化学から購入した。ピリジンはナカライテスクから購入した。

方法：40  $\mu$ mol のアセチル基で保護したリン酸化ビュローロマイシンと600  $\mu$ mol のBz-DMTデオキシシチジンをピリジン (2 ml) を加えては蒸発乾固する操作を3回繰り返すことにより無水化し、最終的に2 ml のピリジンを加え、これに400  $\mu$ mol のDCCを攪拌しながら加え、室温で3日～2週間反応させた (Ralph, R. K. et al. (1965) J. Am. Chem. Soc. 87, 5561-5570及びHarris, R. J. et al. (1972) Can. J. Biochem. 50, 918-926)。反応後、5 ml の80%酢酸で2時間反応させ、DMT基を脱保護した。次に、6 ml の濃アンモニア水-エタノール (体積比2:1) で20℃で2日間反応させてアセチル基を脱保護した。減圧下で蒸発させることにより濃アンモニア水を除去した後40 ml の水で溶解した。この溶液をQAE-Sephadex A-25 (ファーマシア) を充填したカラムに通して吸着させ、0.5M トリエチルアミン炭酸塩 (TEAB, pH7.5) で所望の生成物を含むフラクションを溶出させた後、凍結乾燥し、最終的にHPLCで分離し、脱保護したdGpPurをビュローロマイシンに対して1-5%の収率で得た。

#### ＜2＞核酸部 (in vitroウイルスのゲノム) の調製

In vitroウイルスゲノムとして2種類作成した。すなわち、(1) 核酸部とタンパク質部を部位指定的につなげるためのものと、(2) 核酸部とタンパク質部を部位非指定的につなげるためのものである。

材料：大腸菌の無細胞タンパク質合成系 (E. coli S30 Extract System for Linear Templates) はプロメガから購入。T7 RNAポリメラーゼ、T4 DNAリガーゼ、T4 DNAキナーゼ、ヒト胎盤由来リボヌクレアーゼ阻害剤、EcoRI、BamHI、デオキシリボヌクレオチドは宝酒造から購入した。制限酵素BstNI、BglIIはニュ



ーイングランドラボから購入した。[35S]メチオニン、[γ-32P]ATPはアマシャム、Taq DNAポリメラーゼはクラボウとグライナーのものを使用。他のすべての生化学試薬はシグマ及び和光純薬のものを使用した。ヒトタウタンパク質の微小管結合領域(4リビート)を組み込んだプラスミド(pAR3040)は、λZAPIIにクローニング化されたヒト脳のcDNAライブラリーからヒトタウタンパク質の全長遺伝子をPCR法で釣り上げて、プラスミドに組み込んだものから4リビート領域のみをPCRで増幅してプラスミドに組み込んだものである。PCR (Polymerase chain reaction) 装置は、PTC-100型 (MJリサーチ) とASTEC PC800型 (アステック) を使用した。

#### (1) 部位指定的に結合させるためのゲノムの作成

##### A. 変異4リビート部分のDNA作成

1) ヒトタウタンパク質 (Goedert, M. (1989) EMBO J. 8, 392-399) の微小管領域 (4リビート) を組み込んだプラスミド (pAR3040) 構築し、それを制限酵素BglIIとBamHIによって切断し直鎖状にした。

2) このゲノムからT7プロモーター領域及びシャインダルガノ配列を含んだ4リビート部分をPCRによって増幅した。この際、プライマーとして、5'側は、Left (配列番号1) と3'側はRight (配列番号2) を使った。また、Rightの配列はオーカー終始コドンの前のロイシンをアンバー終始コドンに変異させるようになっている。PCR条件は、変性92°C/30秒、アニーリング65°C/30秒、伸長反応73°C/1分で30回繰り返し返した。

3) 次に、この増幅したゲノムを精製後、メチオニンの取り込みを多くし、放射性同位元素での検出を高めるために、PCRを利用して変異を加えた。すなわち、変異を加えたい領域を含むプライマー-Left- (配列番号3)、Right- (配列番号4) を合成し、上記2) のDNAを鋳型として、まず、プライマー-Left-、LeftでPCRによって増幅し、増幅されたDNAを「Left」とした。また、プライマー-Right-、RightでPCRによって増幅し、増幅されたDNAを「Right」とした。5%アクリルアミド変性ゲル電気泳動により「Left」、「Right」をゲルから切り出し抽出した。切り出したLeftとRightは、まず、プライマーなしで前出の条件でPCRによって増

幅した。さらに、この反応液から1μl採取し鋳型とし、プライマー-Left-、Right-で同じ条件でPCRによって増幅した。これにより、メチオニンの数を1個から4個に増やした変異4リビート部分のDNAが作成された。

##### B. 様々な長さのスベアサをもつアラニン・サブレッサ-2 tRNA (Ala-sup tRNA) の4リビート部分への連結

1) 上記Aの4リビート部分の3'末端側にあるBamHI部位をBamHIを使って切断処理した。その後、BamHI部位の3'側断片の除去のためにQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN製) を使って、5'側の4リビート部分のみを抽出、精製した。

2) 上記1) の精製物と5'側にT4キナーゼでリン酸化したSpacer-A (配列番号5) をSpacer-B (配列番号6) によって裏打ちしT4 DNAリガーゼで結合させた。

3) T4キナーゼでリン酸化したSpacer-C (配列番号7) とこれと相補な領域をもつSpacer-BをT4 DNAリガーゼを使って連結した。15°C、2時間反応させた。その後、エタノール沈澱で精製した。

4) 上記2) 及び3) の産物及びSpacer-D (配列番号8) と5'側をリン酸化したsup tRNA (配列番号9) をT4 DNAリガーゼバッファ (Buffer) に溶かし、85°C、2分で変性させた後、氷上で冷やす。さらにT4 DNAリガーゼを加えて15°C、2時間反応させ、フェノール抽出後、エタノール沈澱した。

5) 上記4) で得た産物を鋳型として、プライマー-Left、プライマー-3' Pur- (配列番号10) を使い、変性92°C/30秒、アニーリング65°C/30秒、伸長反応73°C/1分で30回の条件でPCRによって増幅し、その産物をアクリルアミド変性ゲル電気泳動して、泳動距離の異なる3つの領域A、B、Cを切り出し、DNAを抽出した。

6) 上記5) の長さの異なるA、B、Cを鋳型として再度、同じ条件でPCRによって増幅し、電気泳動によりその長さを同定すると同時に、転写用の鋳型DNAとした。これにより、c画分はSpacer-Cが0~5、b画分は6~14、a画分は15~18挿入されたものであることがわかった。

##### C. RNAゲノムの作成及びdCpPurの連結

上記Bで得られたA、B、C領域はT7ポリメラーゼを用い37°C、2時間反応させることでRNAに転写した。さらに、上記<1>核酸部の3'末端の調製で得られたdCpPur

をATP存在下T4ポリヌクレオチドキナーゼを用い15℃、24時間反応させリン酸化したのち、上記転写RNAゲノムとT4 RNAリガーゼを用い4℃、50時間反応させた。この操作により、3'末端にビューロマイシンを付けたsup tRNAをもつRNAゲノムが構築できた。

## (2) 部位非指定的に結合させるためのゲノムの作成

### A. 変異4リピート部分のDNA及びRNAの作成

変異4リピート部分のDNAは、基本的に上記(1)のAと同一の方法で作成した。ただし、2つの終止コドンすなわちアンバーをグルタミン、オーカーをリジンに替えて終始コドンをなくし、また、3'末端をプリンリッチ (rich) にするために、新しいプライマーNew/Right- (配列番号10) を合成し、Leftととともに変性92℃/30秒、アニーリング65℃/30秒、伸長反応73℃/1分で30回の条件でPCRによって増幅した。このDNAを鋳型として、T7ポリメラーゼを使い37℃、2時間反応させることによりRNAゲノムを得た。

### B. Spacer1~4の連結

上記Aで得たRNAに、21塩基からなるDNA、Spacer1 (配列番号11)、40塩基からなるDNA、Spacer2 (配列番号12)、60塩基からなるDNA、Spacer3 (配列番号13)、80塩基からなるDNA、Spacer4 (配列番号14) をT4ポリヌクレオチドキナーゼで36℃、1時間反応させた後、T4 RNAリガーゼで10℃、48時間反応させた。

### C. ペプチドアクセプター (P-Acceptor) の連結

3'末端にdCpPurを結合させ、リボソームへの取り込みの効率を上げる目的でDN A 21塩基とRNA 4塩基、計25塩基よりなるキメラ核酸、ペプチドアクセプター (P-Acceptor) (配列番号15) を合成した。P-Acceptorの5'末端をリン酸化するためにT4ポリヌクレオチドキナーゼで36℃、1時間反応させた後、これに相補な配列をもつBack3' (配列番号16) によって裏打ちさせ、上記Bで作成した各スパーサーの3'末端にT4 DNAリガーゼを用いて16℃、2時間反応を行い連結させた。また、このP-Acceptorを直接、上記Aで得たRNAの3'末端にT4 RNAリガーゼを用いて10℃、48時間反応させて連結させたものを作成し、これを、Non-Spacerゲノムと称する。

## D. dCpPurの連結

上記Cで作成した各ゲノムの3'末端に、上記<1>核酸部の3'末端の調製で得られたdCpPurをT4ポリヌクレオチドキナーゼを用い15℃、24時間反応させ、リン酸化したのちT4 RNAリガーゼを用い4℃、50時間反応させた。これにより、3'末端にビューロマイシンを付けたキメラRNAゲノムが構築できた。

## <3>核酸部の最適化

### A. 部位指定的方法

上記<2>の(1)で作成したa、b、c画分の長さに分類されたそれぞれのRNAゲノムをピオチン化リジンtRNA (Promega) と一緒に大腸菌無細胞翻訳系50μl [E. coli S30 Extract Systems for Linear Templates (Promega)] で翻訳した後、それぞれのチューブにストレプトアビジン付き磁性体粒子ダイナビーズ (ダイナル) を5mg加え、室温で1時間インキュベートする。次に、ダイナビーズを磁石によって集め、上清を吸い取る。残ったダイナビーズを1000μlのB&W Bufferで2回洗った。さらに、500μlのRT-PCR Bufferで2回洗った後、500μlのRT-PCR Bufferで再度、サスペンド (suspend) する。それを50μl採取し500μlのエッペンチューブに移し、磁石でダイナビーズを固定し、上清を吸い取った。残ったダイナビーズにRT-PCR Buffer及び逆転写酵素とTaq ポリメラーゼ [Access RT-PCR System (Promega)] を加え48℃、1時間で逆転写、PCRは94℃/30秒、65℃/40秒、68℃/1分40秒、40回、プライマーはRight+ (配列番号4) と3' Pur- (配列番号10) で行った。a、b、c画分それぞれを電気泳動で調べたものが第5図である。

ここで、c画分のグループ (第5図のレーン3) からバンドが検出された。このバンドは電気泳動によりゲルから分離し、さらに、T7プロモータ及びシヤインダルカノ領域をもつ「Left」とPCRによって連結し、これをさらにプライマー Left+ (配列番号3) と3' Pur- (配列番号10) でPCRによって増幅した。このゲノムを「Stranger」と名付けた。

次に、このStrangerは実際に翻訳されたタンパク質がmRNA部分 (RNAゲノム部分) と結合しているかどうかを調べるために、転写後、3'側にdCpPurをT4 RNAリガーゼで連結した後RNAの5'側をHK フォスファターゼ (Epicentre) で30℃、1

時間脱リン酸化し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下T4ポリヌクレオチドキナーゼでラベル化した。これを大腸菌無細胞翻訳系にmRNAとして加え、37℃、1時間40分反応させた。これを、18%SDS-PAGEで泳動した結果が第6図である。これから、約80%以上の割合で核酸部（遺伝子型）とタンパク質部（表現型）が結合し、*in vitro*ウイルス、即ち遺伝子型と表現型の対応付け分子が形成されていることがわかる。

#### B. 部位非指定的方法

すでに、部位指定的方法で短いスベースサのものが選ばれてきたため、スベースサなしの「Non-spacer」RNAゲノムの3'末端に、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用い $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下、5'側をリン酸化したdCpPurをT4 RNAリガーゼを用い4℃、50時間反応させ連結させた。次にこれを通常の4リピートをコードしているmRNAとともに大腸菌無細胞翻訳系に加え、37℃、1時間30分反応させた。この反応10 $\mu\text{l}$ をリボヌクレアーゼT2で分解したものと、等量の反応液を18%SDS-PAGEで泳動し、イメージアナライザーBAS2000（富士フイルム）で解析した（第7図）。

その結果、リボヌクレアーゼT2でRNAを分解した方は、タンパク質部分のみとなるため、対照の $[\beta^5\text{S}]\text{メチオニン}$ でラベルした4リピートのタンパク質部分と同じ移動距離のところにバンドが出現した。一方、何の処理も行わない方は、4リピートのタンパク質部分より上に、つまり、分子量が明らかに大きいことがわかった。また、これは、tRNAよりも移動していることからラベルされたmRNA（約400塩基）そのものではない。したがって、RNAと蛋白が結合したものと同定した。すなわち、この結果は核酸部とタンパク質部が部位非指定的に連結したことを示している。

#### 実施例2 *In vitro*ウイルスの調製 (2)

##### <1>核酸部の3'末端部の調製

##### (a) rCpPur (ribocytidylyl[3'→5']puromycin)の合成

材料：ピュロマイシン (puromycin) はシグマから、r C-ベータアミダイト (N4-benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-tert-butylidimethylsilyl)-cytidine-3'-O-[O-(2-cyanoethyl)-N,N'-diisopropyl-phosphoramidite] は日本バーセブティ

ブから、テトラゾールは日本ミリポアから、フッ化テトラブチルアンモニウムはアルドリッチから、QE-セファデックスはファーマシアから、クロマト用シリカゲルはメルクからそれぞれ購入した。

方法：ピュロマイシン (50 mg, 92 $\mu\text{mol}$ ) を2 mlの乾燥ピリジンに溶かし、減圧下で蒸発させ、脱水させた。この操作を3回繰り返した。これに15 mlの4% テトラゾール/アセトニトリル溶液を加え、室温で攪拌させた。反応はシリカゲルの薄層クロマトグラフィー (TLC, 展開溶媒：クロロフォルム：メタノール=9:1) でモニターした。通常、反応は1日で終了する。反応後、溶媒を減圧下で追い出し、これに0.1Mのヨウ素をテトラヒドロフラン/ピリジン/水=80:40:2に溶かした溶液3 ml加え、室温で攪拌させながら生成したホスファイト-トリエステルを酸化させた。1時間半後、溶媒を減圧下で追い出し、残部をクロロフォルムで抽出した。抽出液は無水硫酸マグネシウム存在下で乾燥させた後、減圧下で溶媒を追い出した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、クロロフォルム/メタノール=90:10で溶出させた。保護基のついたリボシチジルピュロマイシン (CpPur) はシリカゲルTLC (展開溶媒：クロロフォルム：メタノール=9:1) でRf 0.32のところに溶出される。次に保護基の脱保護を行った。保護基のついたリボシチジルピュロマイシンを最初80%酢酸水溶液0.5 mlで室温で1時間処理し、酢酸を減圧下で追い出した後、濃アンモニア水/エタノール=2:1の混合溶液0.5 mlを加えた。室温で15時間放置した後、溶媒を減圧下で追い出し、残部に1 Mのフッ化テトラブチルアンモニウムのテトラヒドロフラン溶液0.5 mlを加え、 $\beta$ -シアノエチル基を除去した。30分後溶媒を減圧下で追い出し、残部をQE-セファデックスのカラムクロマトグラフィーにかけ、0-0.5 Mのトリエチルアミン炭酸塩の直線グラジエントで溶出させた。溶出液を集め、凍結乾燥させた。リボシチジルピュロマイシンが10 mg得られた。合成品がリボシチジルピュロマイシンであることは、ヌクレアーゼP1消化でシチジンとピュロマイシン-5'-リン酸が等量得られること、MALDI/TOFマスマスベクトロメトリーでの分子イオンがm/z 777に現われることから同定された。

##### <2>核酸部 (*in vitro*ウイルスのゲノムの調製)

材料：ウサギ網状赤血球抽出液 (Nuclease treated Rabbit reticulocyte lysate) の無細胞タンパク質合成系はプロメガから購入。T7 RNAポリメラーゼ、T4 DNAリガーゼ、T4 RNAリガーゼ、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ、ヒト胎盤由来リボヌクレアーゼ阻害剤、EcoRI、BamHI、デオキシリボヌクレオチドは宝酒造から購入した。制限酵素BstNI、BglIIIはニューイングランドラブラから購入した。[35S]メチオニン、[32P]-γ-ATPはアマシャム、TaqDNAポリメラーゼはクラボウとグライナーのものを使用した。他のすべての生化学試薬はシグマ及び和光純薬のものを使用した。ヒトタウタンパク質のN末端半分領域 (アミノ酸残基番号1-165) を組み込んだプラスミド (pAR3040) は、λZAPIIIにクローニングされたヒト脳のcDNAライブラリーからヒトタウタンパク質の全長遺伝子をPCR法で釣り上げて、プラスミドに組み込んだものからN末端半分領域のみをPCRで増幅してプラスミドに組み込んだものである。PCR (Polymerase chain reaction) 装置はASTEC PC800型 (アステック) を使用した。

#### (1) ゲノムの作製

##### A. N末端半分領域のDNAの作製

3' 末端にスベーター、ベプチドアクセプター、rCpPurの連結したストッパコドンをもつものともたないヒトタウタンパク質N末端半分領域 (アミノ酸残基1-165) をコードするmRNAは以下の通り構築された (第8図)。

- 1) ヒトタウタンパク質 (Goedert, M. (1989) EMBO J. 8, 392-399) のN末端半分領域を組み込んだプラスミド (pAR3040) を制限酵素BglIIIによって切断し直鎖状にする。
- 2) このゲノムからN末端半分領域部分 (アミノ酸残基番号1-165) をPCRによって増幅する。この際、プライマーとして、5' 側はLeft1 (配列番号18)、3' 側はストッパコドンを含むRight1 (配列番号19) とストッパコドンを含まないRight2 (配列番号20) を使った。PCR条件は、変性92℃/30秒、アニーリング65℃/30秒、伸長反応73℃/1分で30回繰り返した。

- 3) T7 RNAポリメラーゼのプロモーター領域、コザック (Kozak) 配列、ヒトタ

ウタンパク質のアミノ酸残基番号1-25までに相当するDNA配列の順につなげたDNA

(配列番号21) は化学合成により調製した。

- 4) 上記2) と3) の操作で得られた二つの複製DNAは次の二段階のPCRにより連結された。すなわち、上記2種のDNAの混合物は最初はプライマー非存在下で増幅され、次いでLeft2 (配列番号22) とRight1 (配列番号19) あるいはRight2 (配列番号20) のプライマー存在下で増幅された。以上の操作により、ヒトタウタンパク質のN末端半分領域のORFの上流にT7 RNAポリメラーゼのプロモーターとコザック配列をもつDNAが作成された。このDNAを鋳型として、T7 RNAポリメラーゼを用い37℃、2時間反応させることによりRNAを得た。

##### B. Spacerとベプチドアクセプターの連結

Spacer5 (配列番号23) とDNA 21塩基とRNA 4塩基、計25塩基よりなるキメラ核酸、ベプチドアクセプター (P-Acceptor) (配列番号15) を化学的に合成した。ベプチドアクセプターの5' 末端をリン酸化するためT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、36℃、1時間反応させた後、これに相補な配列をもつスプリントDNA (配列番号24) によって裏打ちし、Spacer5の3' 末端にT4 DNAリガーゼを用いて、16℃、2時間反応を行い連結させた。

##### C. RNAとSpacer-ベプチドアクセプターの連結

上記Bで得たSpacer5-ベプチドアクセプターの連結体の5' 末端をリン酸化するため、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、36℃、1時間反応させた後、上記Aで得たRNAとT4 RNAリガーゼを用いて、4℃、48時間反応させることにより、連結させた。

##### D. rCpPurの連結

上記Cで作成したゲノムの3' 末端に<1>核酸部の3' 末端の調製で得られたrCpPurをT4 ポリヌクレオチドキナーゼを用い5℃、24時間反応させリン酸化した後、T4 RNAリガーゼを用い37℃、30分反応させた。これにより、3' 末端にピュロマイシンの付いたキメラRNAゲノムが構築できた。

##### E. ヒトタウタンパク質のN末端半分のC末端へのrCpPurの結合

タンパク質のC末端とそれをコードするRNAを有効に連結させるためには、ヒ

ューロマイシンとストッパコドンの間の距離やストッパコドンの有無が重要な因

子になると考えられる。そこでこの分子間結合に対するこれらの因子の影響を調べるために、次のような3つのゲノムを作製した。すなわち、ヒトタウタンパク質のN末端半分(1-165)をコードするmRNAの3'末端に、(1)ストップコドンをもつがDNAスベーターはもたないもの、(2)ストップコドンとDNAスベーターの両者をもたないもの、(3)ストップコドンはもたないがDNAスベーターをもつもの、である。これら3つのゲノムから、32Pで標識したrCpPur存在下でウサギ網状赤血球抽出液を用いた無細胞翻訳系でタンパク質合成を行った(第9図)。  
3'末端にDNAスベーターがついていない場合、ストップコドンの有無に拘わらずタンパク質のC末端にrCpPurが同程度の効率で連結することがわかった。すなわち、rCpPurが連結したタンパク質のバンド(第9図の左から1番目と2番目のレーン)はSDS-PAGE(SDS-ポリアクリルアミド電気泳動)で[35S]メチオニンで標識したタンパク質のモノマー(第9図の一番右のレーン)と同じ位置に現われる。一方、ストップコドンがなくてもDNAスベーターがついていると、rCpPurはタンパク質のC末端に前2者の3倍程度の効率で連結することがわかった(第9図の左から3番目のレーン)。この結果は、リボソームの翻訳停止がDNAの配列上で起こり、その結果rCpPurとタンパク質が効率よく連結するものと考えられる。さらに、この結果はストップコドンがなく、DNAスベーターと3'末端にrCpPurをもつゲノムが無細胞翻訳系でmRNAとして使われた場合、mRNAの3'末端のピュロマイシンが対応する翻訳されたタンパク質のC末端に効率よく結合できることを示唆している。

### ＜3＞無細胞翻訳系でのIn vitroウイルスの構築

前記＜2＞核殻部(in vitroウイルスのゲノムの調製)の項で構築したヒトタウタンパク質のN末端半分(1-165)をコードするmRNA-DNAスベーター(105 mer) - ペプチドアクセプター-rCpPurからなるゲノムをウサギ網状赤血球抽出液を用い翻訳させた。まずヒトタウタンパク質のN末端半分(1-165)をコードするRNAをmRNAとして用い、[35S]メチオニンのタンパク質への取り込みで調べてみると、N末端半分(1-165)のモノマー(～28kDa)とダイマー(～55kDa)の位置にバ

ンドが現われた。この場合、モノマーが主で、ダイマーはごくわずかである(第10図の(A)の左端のレーン)。この結果はヒトタウタンパク質のN末端半分(1-165)をコードするRNAはmRNAとして機能していることを示している。ヒトタウタンパク質のN末端半分(1-165)をコードするmRNA-DNAスベーター(105 mer) - ペプチドアクセプター-rCpPurからなるゲノムを同様な[35S]メチオニンを含む無細胞翻訳系で翻訳させ、時間を追って(5分、10分、20分、40分)調べてみると、モノマーとダイマーの位置の他に、新しい幅広いバンドがゲノムの位置(第10図の(A)の右端のレーン)の少し上の位置に現われた。このバンドの強度は反応時間の経過(第10図の(A)の左から2番目～5番目のレーン)やゲノム量の増加(第10図の(B)のレーン3と4)と共に増加した。この結果はゲノムがピュロマイシンを介してタンパク質のC末端に共有結合で連結したことを示している。また、このことは遺伝子型(genotype)が共有結合で表現型(phenotype)に結びつけられたことを意味している。すなわち、遺伝子型と表現型の対応付け分子が出来たのである。本発明者等は、この対応付け分子をin vitroウイルス(in vitro virus)と名付けた。In vitroウイルスの形成に対するDNAスベーターの長さの影響について調べたところ、80 mer程度の長さでは効率よく形成せず、少なくとも100 mer以上の長さが必要であることがわかった。

さらにin vitroウイルスの生成の確認は、32Pで標識したrCpPurを用いてなされた。すなわち、ヒトタウタンパク質のN末端半分(1-165)をコードするmRNA-DNAスベーター(105 mer) - ペプチドアクセプター-[32P]rCpPurからなるゲノムをウサギ網状赤血球抽出液を用い翻訳させた。ゲノムとタンパク質の結合はナタ豆(mung bean)のヌクレアーゼで消化することによって確認された。すなわち、翻訳産物(第11図のレーン3)をナタ豆のヌクレアーゼで消化すると、ヒトタウタンパク質のN末端半分(1-165)のモノマーとダイマー(第11図のレーン1)に相当する位置にバンドが現われた(第11図のレーン4)。このことは、タンパク質のC末端に32Pで標識されたrCpPurが付いていることを意味している。この結果からもゲノムがピュロマイシンを介してタンパク質のC末端に共有結合で連結したことがわかる。結合の効率は約10%と推測された。40～

100 pmol/mlの濃度のin vitroウイルスゲノムは調製できるので、生成したin vitroウイルスは $2.4 \sim 6 \times 10^{12}$ の変異体を含む集団からなり、この数はファージ・ディスプレイ法 (Scott, J. K. & Smith, G. P. (1990) Science 249, 386-390) の1万倍に相当する。In vitroウイルスを用いた遺伝子型と表現型の対応付けは、透過性の問題が回避できたり、種々の非天然のアミノ酸の導入が可能などの長所をもっており、非常に沢山の変異体の合成や種々の機能性タンパク質の生成を可能にする。

### 実施例3 In vitroウイルスを用いたタンパク質の進化実験方法

In vitroウイルスを用いてのタンパク質の進化実験方法は、第12図に示すように、(1) in vitroウイルスゲノムの構築、(2) in vitroウイルスの完成、(3) 淘汰プロセス、(4) 変異導入、(5) 増幅、の工程からなり、機能性タンパク質の改変及び創製が可能とする。特に、この工程を繰り返すことにより効率的な機能性タンパク質の改変及び創製が可能となる。この内、(1) 及び (2) の工程については上記実施例1及び2で具体的に述べた。ここでは (3)、(4) 及び (5) の工程について述べる。

まず、抗体に特異的なペプチドが淘汰されるかどうかについて検討した。具体的には抗体はマウスIgGを用い、抗体に特異的に結合するペプチド配列は既知のプロテインAのZZ領域 (Nilsson, B., et al., (1987) Protein Eng., 1, 107-113) を用いた。また、コントロールとしてはヒトタウタンパク質のN末端領域 (1-105) (Goedert, M. (1989) EMBO J. 8, 392-399) を用いた。上記実施例1及び2で述べたin vitroウイルスの構築方法に従い、プロテインAのZZ領域とヒトタウタンパク質のN末端領域 (1-105) をコードするin vitroウイルスゲノムを作製した。プロテインAのZZ領域を含むin vitroウイルスゲノムとヒトタウタンパク質のN末端領域 (1-105) を含むin vitroウイルスゲノムの比率を1:1、1:10、1:100、1:1000のように変え、ウサギ網状赤血球抽出液を用いた無細胞翻訳系で30℃、10分間翻訳させた。その後、翻訳産物を希釈し、遠心分離を行って不溶性画分を除去し、その上清をマウスIgGを吸着させたマイクロプレート (牛血清

アルブミンでブロッキング処理済) に加え、4℃で2時間静置した。その後、マイクロプレートから翻訳産物を除き、洗浄用緩衝液 (50 mM Tris酢酸、pH 7.5/150 mM 食塩/10 mM EDTA/0.1% Tween 20) で計6回洗浄し、溶出用緩衝液 (1M酢酸、pH 2.8) で2回溶出した。溶出液をエタノール沈殿させ、20  $\mu$ lの滅菌水で溶解して、逆転写PCRのテンプレートとした。逆転写PCRは逆転写酵素 (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase、プロメガ製) とDNAポリメラーゼ (Tfi DNA Polymerase、プロメガ製) とプライマーとしてRT+ (配列番号25) 及びRT- (配列番号26) とを用い、48℃で40分反応させた後、94℃で5分間処理で逆転写酵素を失活させ、次いで、94℃で30秒、66℃で40秒、72℃で40秒のサイクルを30回繰り返した。得られたPCR産物は、8M尿素を含む4%ポリアクリルアミドゲルを用い、55℃で電気泳動し、銀染色して確認した。その結果、プロテインAのZZ領域を含むin vitroウイルスゲノムはコントロールゲノムであるヒトタウタンパク質のN末端領域 (1-105) を含むin vitro ウイルスゲノムの10分の1量でも増幅できることがわかった。この結果は、プロテインAのZZ領域を含むin vitroウイルスゲノムが翻訳されたプロテインAのZZ領域を介してマウスIgGに特異的に結合したことを示している。それ故、in vitroウイルスが淘汰できることが明らかになった。変異導入及び増幅はすでに確立しているError-prone PCR (Leung, D. W., et al., (1989) J. Methods Cell Mol. Biol., 1, 11-15) やSexual PCR (Stemmer, W. P. C. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10747-10751) を用いれば可能である。したがって、第12図に示したin vitroウイルスを用いたタンパク質の進化実験方法は実行可能であることが証明された。

### 産業上の利用可能性

本発明により、遺伝子型 (核酸部) と表現型 (タンパク質部) の対応付け分子及びその構築方法が提供される。また、本発明により構築した対応付け分子 (in vitroウイルス) を試験管内淘汰法により淘汰し、選択された極く少量のin vitroウイルスの遺伝子部分を逆転写PCRにより増幅し、さらに変異を導入しながら増幅することを特徴とするin vitroウイルスを用いたタンパク質の進化実験方法等

が提供される。本発明の遺伝子型と表現型の対応付け分子やそれを用いたタンパク質の進化実験方法等は、進化分子工学、すなわち、酵素、抗体、リポザイムなどの機能性生体高分子を高機能をもち、さらには生物から見出せない機能をもった生体高分子の創製等において用いる極めて有用な物質や実験系である。

## 配列表

## (1) 一般情報

- (i) 出願人：三菱化学株式会社
- (ii) 発明の名称：遺伝子型と表現型の対応付け分子及びその利用
- (iii) 配列数：26
- (iv) 連絡先
  - (A) 宛名：三菱化学株式会社
  - (B) 番地：丸の内二丁目5番2号
  - (C) 市：千代田区
  - (D) 州：東京都
  - (E) 国：日本国
  - (F) ZIP：103
- (v) コンピュータ読取り可能形式
  - (A) 媒体：フロッピーディスク
  - (B) コンピュータ：IBM PC 互換
  - (C) 操作システム：PC-DOS/MS-DOS
  - (D) ソフトウェア：Patentin
- (vi) 現行出願データ
  - (A) 出願番号：
  - (B) 出願日：17.10.97
  - (C) 分類：
  - (D) 書類記号：E9712870629
- (vii) 先の出願データ
  - (A) 出願番号：JP 1996274855
  - (B) 出願日：17.10.96

## (2) 配列番号 1 に関する情報

- (i) 配列の特徴
    - (A) 長さ：33
    - (B) 型：核酸
    - (C) 鎖の数：一本鎖
    - (D) トポロジー：直鎖状
  - (ii) 配列の種類：他の核酸
    - (A) 説明：合成DNA
  - (ix) 配列の特徴
    - (D) 他の情報：T7プロモーター上流
  - (xi) 配列：配列番号 1  
GAGCATAGAT CTCGATCCCG CGAAMTTAAT ACC
- (2) 配列番号 2 に関する情報
- (i) 配列の特徴

- (A) 長さ：33  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジ：直鎖状  
(ii) 配列の種類：他の核酸  
(A) 説明：合成DNA  
(ix) 配列の特徴  
(D) 他の情報：終始コドンを含む  
(xi) 配列：配列番号2  
GCAGCGGAT CCTTACTACT TGTGGGTTTC AAT

33

- (2) 配列番号3に関する情報  
(i) 配列の特徴  
(A) 長さ：33  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジ：直鎖状  
(ii) 配列の種類：他の核酸  
(A) 説明：合成DNA  
(ix) 配列の特徴  
(D) 他の情報：開始コドンを含む、配列番号4と相補  
(xi) 配列：配列番号3  
GCACATGACA TTCATCATGT CTGGCATATG TAT

33

- (2) 配列番号4に関する情報  
(i) 配列の特徴  
(A) 長さ：33  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジ：直鎖状  
(ii) 配列の種類：他の核酸  
(A) 説明：合成DNA  
(ix) 配列の特徴  
(D) 他の情報：開始コドンを含む、配列番号3と相補  
(xi) 配列：配列番号4  
ATACATATGC CAGACATCAT GAATGTCATG TCC

33

- (2) 配列番号5に関する情報  
(i) 配列の特徴  
(A) 長さ：16  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖

- (D) トポロジ：直鎖状  
(ii) 配列の種類：他の核酸  
(A) 説明：合成DNA  
(ix) 配列の特徴  
(D) 他の情報：配列番号6と相補な部分を有する  
(xi) 配列：配列番号5  
GATCTATTTC TTTATTC

16

- (2) 配列番号6に関する情報  
(i) 配列の特徴  
(A) 長さ：17  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジ：直鎖状  
(ii) 配列の種類：他の核酸  
(A) 説明：合成DNA  
(ix) 配列の特徴  
(D) 他の情報：配列番号5と相補な部分を有する  
(xi) 配列：配列番号7  
GAACACAAATA AGAAATA

17

- (2) 配列番号7に関する情報  
(i) 配列の特徴  
(A) 長さ：17  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジ：直鎖状  
(ii) 配列の種類：他の核酸  
(A) 説明：合成DNA  
(ix) 配列の特徴  
(D) 他の情報：配列番号6と相補な部分を有する  
(xi) 配列：配列番号7  
TCTTCTATTT CTATTTC

17

- (2) 配列番号8に関する情報  
(i) 配列の特徴  
(A) 長さ：30  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジ：直鎖状  
(ii) 配列の種類：他の核酸  
(A) 説明：合成DNA



## (ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：配列番号9と相補な部分を有する

## (xi) 配列：配列番号8

GGCTAACGA ATGACAAGA ATAGCAATA

30

## (2) 配列番号9に関する情報

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ：108

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明：合成DNA

## (ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：アラニン-tRNAの配列を有する

## (xi) 配列：配列番号9

TTGTTCAATC GTTACCGG GCGTATAGCT CAGCTGGAG AGGCCTGCT TCTAACGCAG  
GAGGTCGG GTTCGATCC GCGTAGCTCC ACCAGGAGGC GACTAGCT60  
108

## (2) 配列番号10に関する情報

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ：23

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明：合成DNA

## (ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：アラニン-tRNAの5'側の配列の一部を有する

## (xi) 配列：配列番号10

GTGGACCTAC GCGGATCGA ACC

23

## (2) 配列番号11に関する情報

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ：25

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明：合成DNA

## (ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：終始コードをもたない

## (xi) 配列：配列番号11

GCACCCGAT CCTTCTGCT TGTCG

25

## (2) 配列番号12に関する情報

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ：21

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明：合成DNA

## (ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：配列番号17と一部相補な配列をもつ

## (xi) 配列：配列番号12

CTTTATGAC CTCCTCTC C

21

## (2) 配列番号13に関する情報

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ：40

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明：合成DNA

## (ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：配列番号17と一部相補な配列をもつ

## (xi) 配列：配列番号13

CTTTATAAT TTTTTTTT TTTATGACC TCCCTCTCC

40

## (2) 配列番号14に関する情報

## (i) 配列の特徴

(A) 長さ：60

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：他の核酸

(A) 説明：合成DNA

## (ix) 配列の特徴

(D) 他の情報：配列番号17と一部相補な配列をもつ

## (xi) 配列：配列番号14

CTTTATAAT TTTTTTTT TTTTTTTT TTTATGACC TCCCTCTCC

60

AAAAGACA GTAAGGGA GGGAGGTCA TTA

CTCTGGCACTTCTTGGCTCCC

## (2) 配列番号 2 1 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 118
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 説明: 合成DNA

## (ix) 配列の特徴

- (D) 他の情報: T7RNAポリメラーゼのプロモーター領域、kozak配列、ヒトタウタンパク質のアミノ酸残基番号1-25に相当するDNA配列を含むDNA

## (xi) 配列: 配列番号 2 1

GATCCGGCGA AATTAAATAG ACTCACTATA GGGAGACCAC AACGGTTTCC CTCTAGAAAT  
AATTTCGTTT AACTTTAAGA AGGAGATGCC ACCATGGTTG AGCCCGCGCAT GGAAGTTGG

60

118

## (2) 配列番号 2 2 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 30
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 説明: 合成DNA

## (ix) 配列の特徴

- (D) 他の情報: T7RNAポリメラーゼのプロモーターの一部を含む5'末端領域

域

## (xi) 配列: 配列番号 2 2

GATCCGGCGA AATTAAATAG ACTCACTATA

30

## (2) 配列番号 2 3 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 105
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 説明: 合成DNA

## (ix) 配列の特徴

- (D) 他の情報: Spacer5

## (xi) 配列: 配列番号 2 3

AAGCCACTCG CGTGGCTCG CATTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT  
TTTTTTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT TTTTCTTTT

60

105

## (2) 配列番号 2 4 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 25
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 説明: 合成DNA

## (ix) 配列の特徴

- (D) 他の情報: スプリントDNA

## (xi) 配列: 配列番号 2 4

AAAGACAGTA AGGGAGAGGG GAGGT

25

## (2) 配列番号 2 5 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 47
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 説明: 合成DNA

## (ix) 配列の特徴

- (D) 他の情報: 逆転写PCR用プライマー

## (xi) 配列: 配列番号 2 5

GCTTCCCTC TAGAATAAT TTTGTTTAC TTTAAGANGG AGATATA

47

## (2) 配列番号 2 6 に関する情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 25
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジ: 直鎖状
- (ii) 配列の種類: 他の核酸
- (A) 説明: 合成DNA

## (ix) 配列の特徴

- (D) 他の情報: 逆転写PCR用プライマー

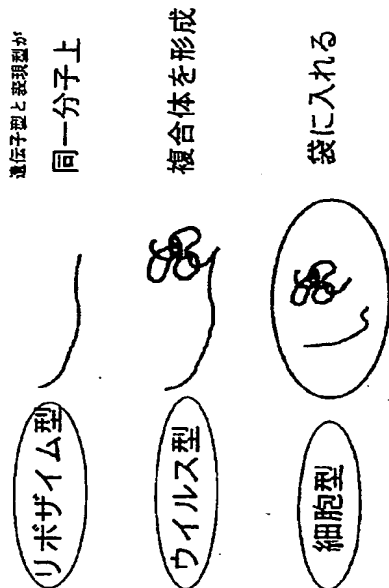
## (xi) 配列: 配列番号 2 6

AGCTTTCAGG CCAGCGTCCG TGTCG

25

【図1】

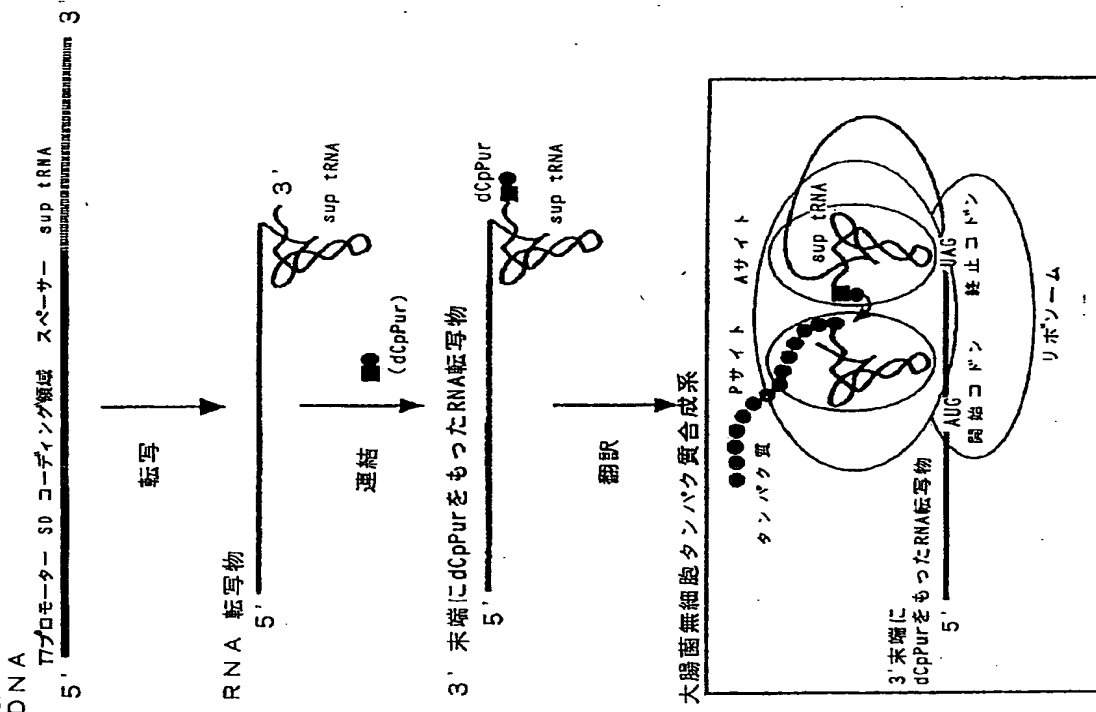
遺伝子型と表現型の対応付け戦略



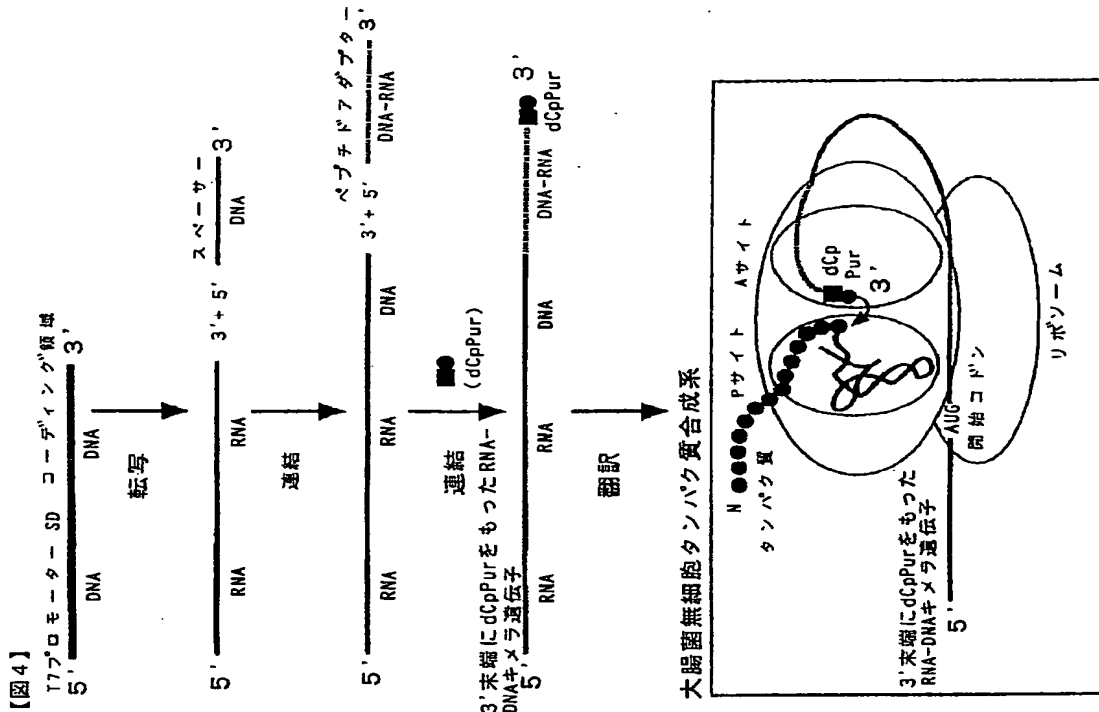
対応付け戦略は、論理的に3つのパターンに分類できる。

第1図

【図2】



第2図



第4図

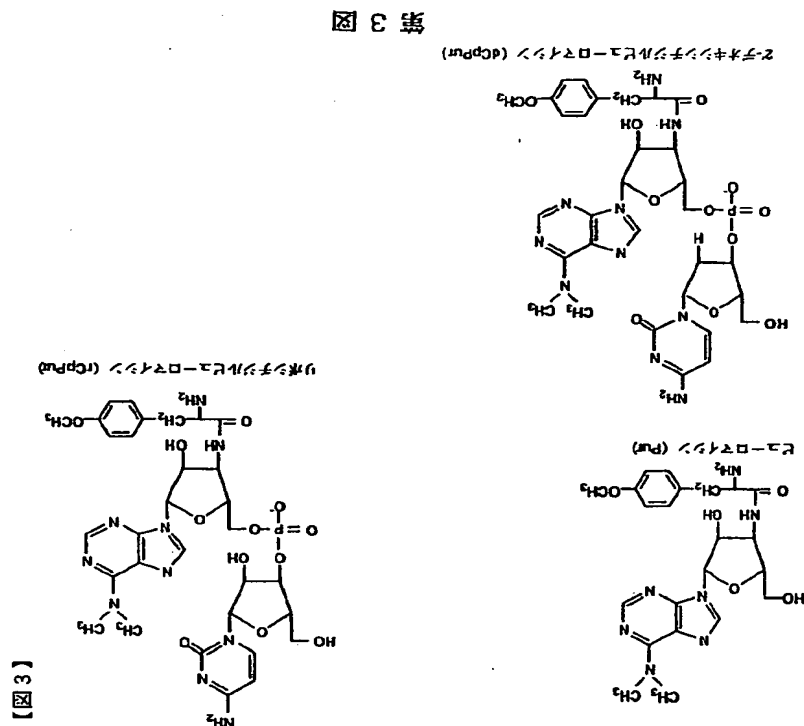
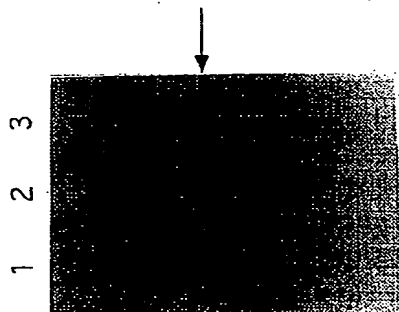
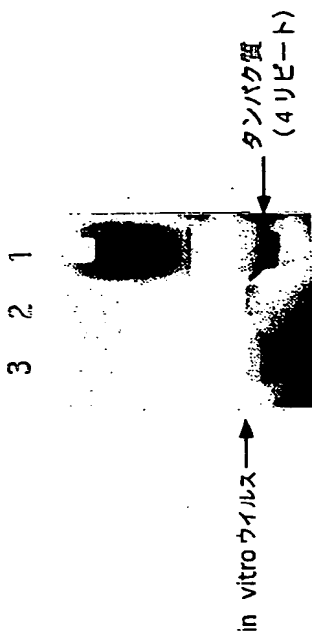


図3 概

【図5】

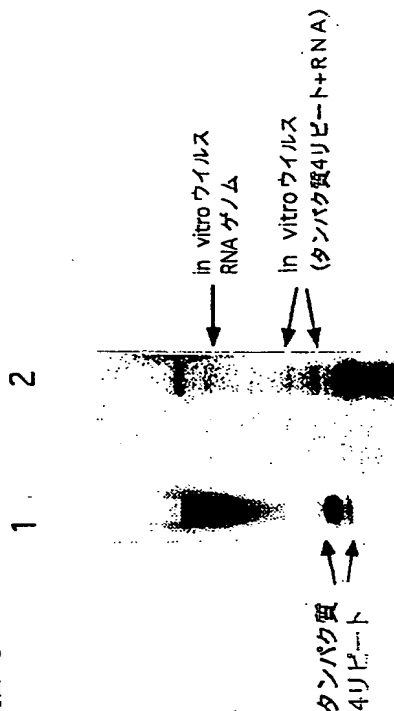


【図7】



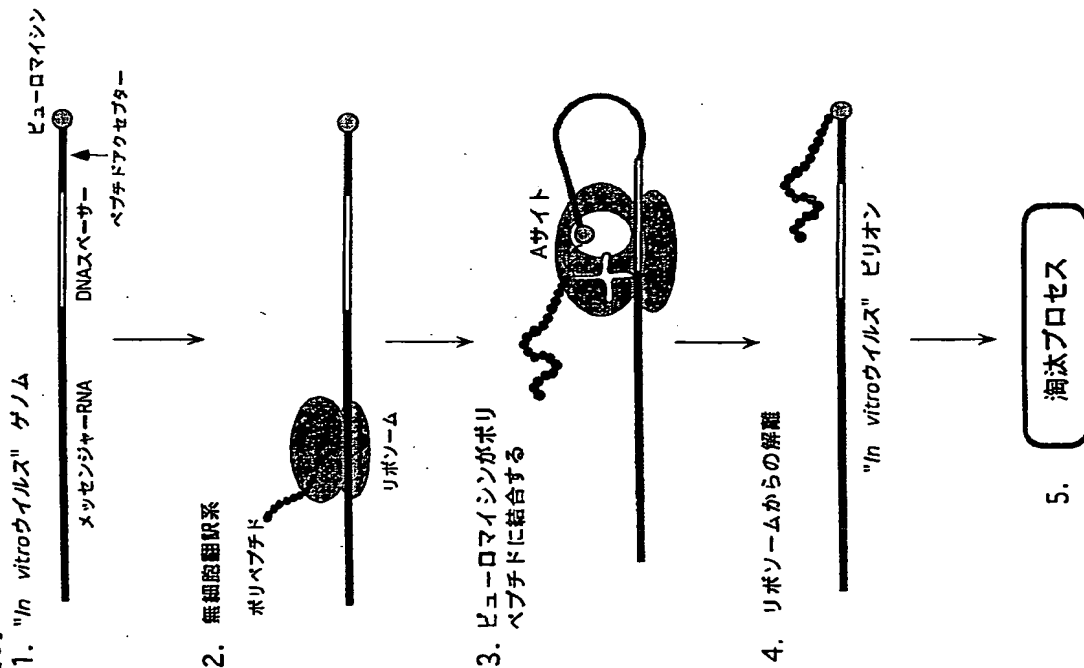
第7図

【図6】



第6図

【図8】



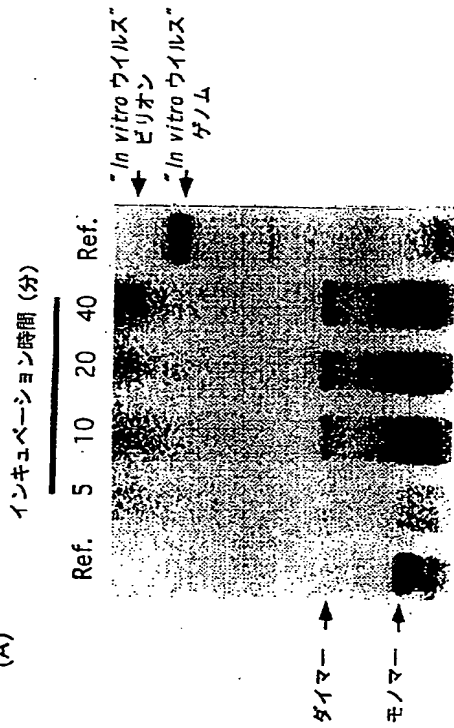
第8図

【図9】

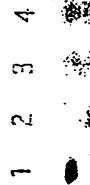


第9図

【図10】  
(A)

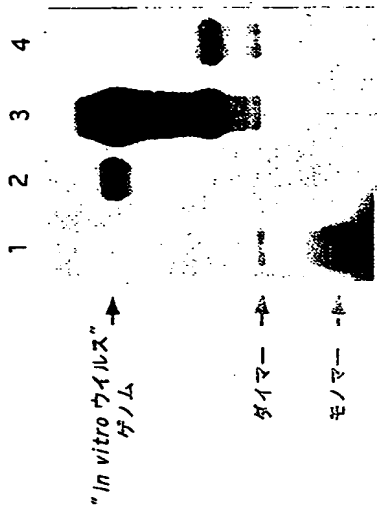


(B)



第10図

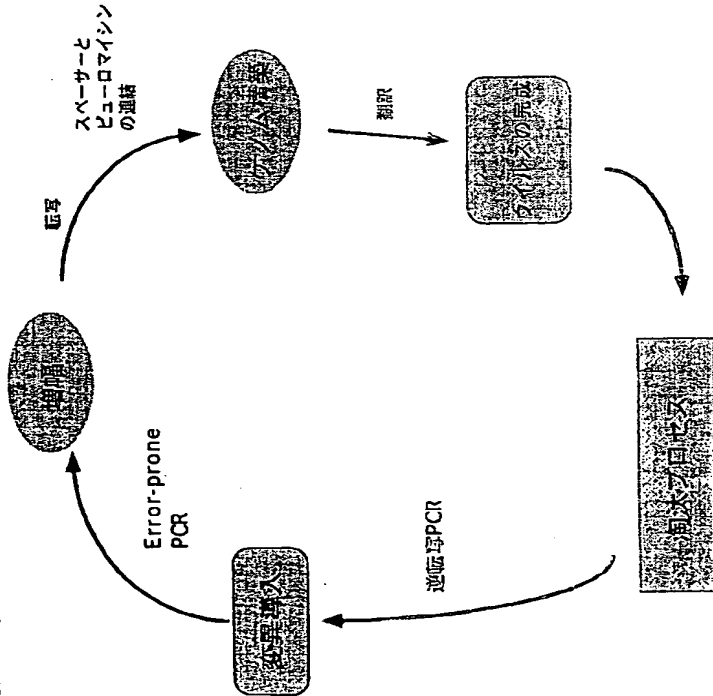
【図11】



第11図



【図12】



第12図

【国際調査報告】

国際調査報告		国際出願番号	PCT/JP97/03766
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. C12N15/11, C12P21/00, C12Q1/68			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. C12N15/11, C12P21/00, C12Q1/68			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), CA (STN)			
C. 調査すると認められる文献			
引用文献の カテゴリ	引用文献名、及び一部の箇所が関連するものは、その関連する箇所の表示	関連する 箇所の範囲の番号	1, 2, 4
X	Progress in Biophysics and Molecular Biology, Vol. 65 (Suppl. 1) (1994 Aug) Husdal Y <i>et al.</i> (Role of the Virus-type strategy in encoded molecular evolution) p. 64		
PX	FEBS Letters, Vol. 414 (2) (1997-Sep-8) Nemoto H. <i>et al.</i> (In vitro virus-binding of mRNA bearing purpocin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro) p. 405-408		1-21
A	WO. 96/22391, A1 (The Scripps Research Institute) 26. 7月. 1996 (25. 07. 96) &US. 5559000, A &AU. 9653530, A		1-21
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特許出願のある文献ではなく、一般の技術文献を示す 「E」 先行文献であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に拠る発明を提起する文献又は他の文献の発行 日若しくは後の特許性理由を提出するために引用する 文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に基及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって 出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理 論の理解のために引用するもの 「X」 特許出願のある文献であって、当該文献のみで発明 の新規性は支持されないと考えられるもの 「Y」 特許出願のある文献であって、当該文献と他の1以 上の文献との、当業者にとって自明である組合せに よって支持されないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を終了した日		08. 01. 98	
国際調査報告の発布日		20.01.98	
国際調査機関の名称及び国名 日本特許庁 (ISA/JP) 審査番号100 東京部千代田区蔵三丁目4番3号		特許庁審査官 (機関のある国) 田中 龍子	
		4B 9458	
		電話番号 03-3581-1101 内線 3449	

国際調査報告			国際出願番号	PCT/JP97/03766
C (発明)	関連すると認められる文献	関連する		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一語の箇所が関連するときは、その関連する箇所の指示 (Searching for Peptide Ligands with an Affymax Technologies)	開示する 開示の範囲の番号		
A	WO, 95/11822, A1 (Affymax Technologies) 4, 5B, 1995 (04.05.95) &AU, 9653530, A	1-21		
A	Science, Vol. 249(1990) Scott J.K. <i>et al.</i> (Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library: p. 389-390	1-21		
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89(1992) Brenner S. <i>et al.</i> (Encoded combinatorial chemistry) p. 5381-5383	1-21		

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1992年7月)

(注) この公表は、国際事務局 (WIPO) により国際公開された公報を基に作成したものである。

なおこの公表に係る日本特許出願 (日本特許庁新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項 (実用新案法第48条の13第2項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**